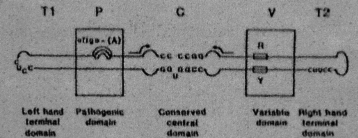
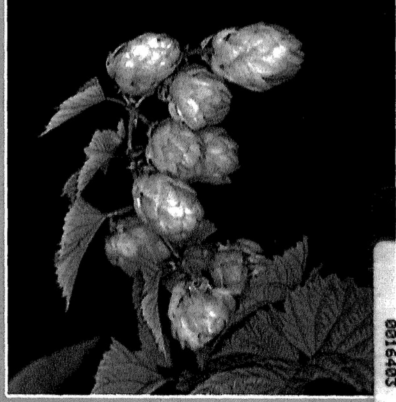
الفيرويد

والأمراض الفيرويدية



دكتور محمود موسى أبو عرقوب





المكتبة الاكاديمية

الفيروید

والأمراض الفيروسية

الفيرويد

والأمراض الفيرويدية

تأليف الدكتور

محمود موسى ابو عرقوب

أستاذ أمراض النبات بكلية الزراعة جامعة

قاريونس سابقاً



الناشر

المكتبة الاكاديمية

١٩٩٦

حقوق النشر

المكتبة الأكاديمية

١٢١ ش التحرير - الدقى - القاهره

تليفون: ٣٤٨٥٢٨٢ / ٣٤٩١٨٩٠

تلكس: ABCMN U N ٩٤١٢٤

فاكس ٣٤٩١٨٩٠ - ٢٠٢


بسم الله الرحمن الرحيم

كلمة شكر

بسم الله الرحمن الرحيم والصلاة والسلام على سيدنا محمد وعلى آله وصحبه آجمعين وبعد: إن من يستحق الشكر دائماً وبدون إنقطاع هو الله سبحانه وتعالى «رب اوزعنى أن أشكر نعمتك التى أنعمت علىّ وعلى والدى» لنعمه التى لا تحصى ولا تعد «وإن تعدوا نعمة الله لا تحصوها». ولكن جرت عادات البشر أن يشكر الانسان كل من قدم إليه معروفاً أو أسدى إليه احساناً. إننى أسجد لله شاكراً العلى العظيم الذى الهمنى الصبر وامدنى بالطاقة ومعونة السفر لانجاز هذا الكتاب. وحيث أننى سافرت وقابلت كثيراً من الباحثين فى جميع أنحاء العالم وقدموا لى المساعدة الكبيرة وإنى أشكر هؤلاء العلماء الذين لم يبخلوا علىّ بانتاجهم. إنى أشكر العلماء الاتية اسماؤهم لما قدموه لى من أبحاث سواء لهم أو لزملائهم وهم مرتبين حسب كمية العطاء الذى قدموه لى وهم:-

عدد الأبحاث المقدمة للمؤلف	البلد	اسم العالم
١٤	اليابان	1 - Yoshimi Okada.
١١	اسبانيا	2 - Ricardo Flores.
٨	استراليا	3 - Mohamed Ali Rezaian.
٨	استراليا	4 - Mark W. Schwinghamer.
٨	اسبانيا	5 - Duran - Vila N.
٦	اسبانيا	6 - Jose Maria Belles.
٥	استراليا	7 - Robert H. Symons.

عدد الأبحاث المقدمة للمؤلف	البلد	اسم العالم
٤	المانيا	8 - Detlev Riesner.
٤	بولندا	9 - Elzbiete Paduch - Cichal.
٤	نذرلاند	10 - Harm Huttinga.
٤	بريطانيا	11 - Adams N.A.
٣	اليابان	12 - Satoshi Naito.
٣	البرازيل	13 - Kitajima E.W.
٣	اسرائيل	14 - Moshe Bar - Jseph.
٢	الفلبين	15 - Velasco J.R.
١	اليابان	16 - Yamaya Jun.
١	إيطاليا	17 - Julian chela - Flores.

هذا ولا أنسى أن أقدم شكرى للسيدة الدكتورة ناهد عبد المجيد زاهر فى قسم الفيرس فى مركز البحوث الزراعية القاهرة.

كما وأنى أشكر الأستاذ أحمد أمين الذى رحب بنشر هذا الكتاب وأشكر المهندس حمدى قنديل الذى دائما ما يبذل الجهد الجهيد فى إظهار الكتاب فى أحسن صورة.

«والحمد لله من قبل ومن بعد»

المؤلف الدكتور

محمود موسى أبو عرقوب

المحتويات

مقدمة

بسم الله الذى علم الانسان ما لم يعلم، لقد ترددت كثيراً فى ولوج هذا المدخل حين فكرت فى اصدار كتاب فى موضوع الفيرويدات وإنتابتنى هواجس كثيرة وذلك لأن هذا العلم صعب وحديث وإن الناقدين موجودون بالمرصاد لكل محاولة فى مجال جديد. زيادة على ذلك لا يوجد أى كتاب أو نشرة باللغة العربية تتكلم فى هذا الموضوع وخفت أن أنزلق فى مسالك الهلاك وخاصة حتى تخوض فى هذا العلم يجب أن تكون ملماً بكثير من العلوم مثل الكيمياء الحيوية والجزيئية والهندسة الوراثية وأمراض النبات.

وبعد أن استخرت الله سبحانه وتعالى إنقشعت عن ذهنى هذه المخاوف واختمرت هذه الفكرة فى خيالى وبدأت السفر والترحال وأقلب وجهى فى مشارق الدنيا ومغاربها حتى أستطيع الحصول من العلماء والباحثين على أحدث الأبحاث وأشملها لكى أقدم كتاباً فيه شئ مما يصبو إليه القارئ العربى والمتخصص فى علم أمراض النبات. عقدت العزم وتوكلت على الله وبدأت أبحث وأنقب عن مراكز أبحاث الفيرويد والعلماء واقابلهم أو أتصل بهم حتى استطعت أن احصل على ما يقارب من ثمانين بحثاً ثم اكملت ذلك من المكتبات وجمعت معظم إن لم يكن كل ما كتب عن الفيرويد باللغة الانجليزية (هناك أبحاثاً كثيرة باللغة اليابانية والصينية والايطالية) من سنة ١٩٧١ حتى ١٩٩٤ ونقلته باختصار شديد ولاقيت معاناة كبيرة فى التعامل مع الكم والكيف لهذه الابحاث وخاصة الاصطلاحات العلمية ونقلت كل ذلك فى صورة مبسطة فى هذا الكتاب.

إن اولى المشكلات التى قابلتنى فى تحضير هذا الكتاب هى المصطلحات العلمية الخاصة بالهندسة الوراثية والكيمياء الجزيئية، وهذه الشكوى مكررة فى كل ما كتبت من كتب قبل هذا الكتاب وإنى أطلب من مجمع اللغة العربية أن يضعوا لنا حلاً لهذه المشكلة، وإلا بقينا نقدم رجلاً ونؤخر أخرى فى تأليف وترجمة الكتب العلمية الحديثة. ونحن الآن نعتمد على اجتهادات خاصة فى تفسير المصطلحات العلمية قد تكون مناسبة وقد لا تكون ولكن هذه هى الحلول الموجودة.

تعتبر الفيرويدات كائنات صغيرة (كلمة كائن باللغة العربية الفصحى تعنى شئ موجود وهى مشتقة من الكينونه وليست مقتصرة على الحى أو غير الحى) جداً تقاس بالنانوميتر (واحد على بليون من المتر) وطولها يساوى ٥٠ نانوميتر ووزنها الجزيئـى صغـير جداً يسـاوى $\frac{١}{١٠٠٠}$ من الوزن الجزيئى لاصغر فيرس. يتركب الفيرويد من حمض نووى RNA احادى الخيط وتأخذ الشكل الدائرى أوالمستقيم شبه العصوى وقد تتفرع احياناً أو يتكون بها تركيب دبوس الشعر أو تركيب رأس المطرقة، وكل ذلك فى اوضاع وظروف معينة مشروحة فى الكتاب بالتفصيل. يتركب الفيرويد من نيوكليتيدات حوالى ٢٤٦ لاصغر فيرويد و ٣٧٥ لاكبر فيرويد ولا نستطيع الجزم بهذه الأرقام لأن العلم كل يوم يأتى بجديد (بعض الباحثين قال إن بعض الفيرويدات يتركب من ٦٠٠ نيوكليتيده وهو بذلك وقع فى خطأ علمى (وما أكثر الأخطاء العلمية فى الفيرويدات) لأنه وجد جزيئين من الفيرويد كل منها ٣٠٠ نيوكليتيدة مرتبطان مع بعضهما البعض).

تسبب الفيرويدات امراضاً على النباتات الزهرية ولم يظهر حتى سنة ١٩٩٤ أنها تصيب النباتات غير الزهرية أو الحيوانات ولكن كما قلنا فإن العلم كل يوم يأتى بجديد. إن كثيراً من الأمراض التى كانت تعتبر أمراض فيروسية قد إنسخلت عن قسم الأمراض الفيروسية وأصبحت منضمة فى أعداد الأمراض الفيرويدية بعد أن تأكد عدم صحة التشخيص الأول لهذه المسببات. سوف لا يمضى طويل وقت حتى تصبح قائمة الأمراض الفيروسية المتحولة إلى الأمراض الفيرويدية طويلة جداً.

إن سبب هذا التحول هو التقدم العلمى الهائل الذى حصل فى الكيمياء الجزيئية والهندسة الوراثية وطرق الفصل والتحليل التى تطبق على الحمض النووى RNA.

قبل السبعينات من هذا القرن لم يكن للفيرويدات أى ذكر ولم تكن قد عرفت، إلا أن العالم T.O.Diener بأبحاثه المستمرة على مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس استطاع أن يكتشف أن مسبب المرض ليس فيرس وإنما كائن قريب الشبه بالفيرس وسماه فيرويد وذلك سنة ١٩٧١. ثم بعد ذلك إنتشرت الأبحاث على هذه الكائنات وبعد ستة عشر عاماً يعنى سنة ١٩٨٧ أمكن اكتشاف عشرة فيرويدات ودراستها دراسة وافية ثم بعد ذلك استمرت اكتشافات الفيرويدات ولغاية سنة ١٩٩٤ أمكن اكتشاف ما يربو على ٣٠ فيرويد. يعتبر فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس هو أكثر الفيرويدات التى نالت قسطاً وافراً من الدراسة، وجميع أسس علم الفيرويد أخذت من نتائج الدراسة على فيرويد الدرنة المغزلية. كذلك فإن العالم Diener هو أكثر العلماء أبحاثاً على الفيرويد.

نستطيع أن نقول إن علم الفيرويد قد ولد وشب وأيفع فى فترة قياسية من الزمن أو يمكن القول بأنه ولد يافعاً وذلك لأنه فى فترة ربع قرن تقريباً حدث له تقدم سريع يقابل ما حصل لعلم الفيرس فى أكثر من ثمانين سنة تقريباً وذلك يعود للتقدم السريع فى الكيمياء الجزيئية والهندسة الوراثية.

إن طرق العزل الحديثة وطريقة PAGE وما حدث لها من تحورات وتطورات كبيرة ساعدت كثيراً فى اكتشاف الفيرويد وتقديره فى مستخلصات النبات. إن هذه الطريقة أمكن بواسطتها اكتشاف الفيرويد بكمية قليلة جداً تقدر بالبيكوغرام وهذا الوزن يساوى واحد من بليون (مليون مليون) غرام. زيادة على ذلك فإن طرق استعمال المنقبات والبوادئ والحمض النووى المكمل والكلونة، أمكن بواسطتها السير بخطى سريعة فى مجال الفيرويد حتى أصبح علم الفيرويد من العلوم الشائعة فى جميع أقسام أمراض النبات وأقسام الأحماض النووية فى معظم أنحاء العالم.

إن هذا الكتاب الذى بين أيدينا يقع فى جزئين، الجزء الأول يتكلم عن

الفيرويدات بشكل عال ويتكون من أربعة فصول، الفصل الأول يتكلم عن الفيرويد من حيث تطور علم الفيرويد وأدلة وجود الفيرويد وجميع صفات الفيرويد. أما الفصل الثانى يتكلم عن الفيرويدات وتفاعلاتها مع العائل ومقارنة الفيرويدات مع الفيروسات والفيروسايدات. أما الفصل الثالث فيتكلم عن الدراسات الحديثة للفيرويدات من حيث النطاقات وإختلاف التتابع فى تنوعات الفيرويدات وتشخيص الفيرويدات. أما الفصل الرابع يتكلم عن الدراسات التطبيقية فى علم الفيرويدات من حيث بناء فيرويد معدى أو المعالجة بالحرارة المنخفضة أو تثبيط الإصابة الفيرويدية أو الوقاية بالتضاد والتداخل بين الفيرويدات المحقونة معاً.

أما الجزء الثانى من الكتاب فيتكلم عن الأمراض الفيرويدية. يتكلم عن المرض المتسبب عن الفيرويد وأعراض المرض واسم الفيرويد المسبب وصفاته وطرق الانتقال. وقد قسمت هذا الجزء إلى ثلاثة فصول الفصل الخامس يتكلم عن الأمراض المتسببة عن فيرويدات تحت المجموعة B_1 الذى يمثلها فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس. أما الفصل السادس يتكلم عن فيرويدات تحت مجموعة B_2 وB_3. وحيث أن فيرويدات مجموعة A تحتوى على فيرويدين فقط فإنى جعلتها فى آخر الكتاب فى الفصل السابع.

هناك بعض الفيرويدات لا تزال تحت الأبحاث أو فى بداية الاكتشاف وهذه الفيرويدات وضعتها فى آخر الكتاب حتى تتم الفائدة، وعن كل فيرويد كتبت المرجع الذى أخذ منه هذا البحث ولم اكتب هذا المرجع فى المراجع العامة. إنى كتبت مراجع هذه الفيرويدات الحديثة معها فى نفس الصفحة حتى يتأكد القارئ أن كل ما فى هذا الكتاب يمكن الرجوع إليه والأستزادة منه.

أما بالنسبة للمراجع ففى الجزء الأول كتبت فى نهاية كل فصل عدة مراجع خاصة جداً بهذا الفصل حتى يمكن الرجوع إليها أما فى نهاية الكتاب فكتبت حوالى ٢٩٠ مرجع سواء كتب أو مجلات وهذه المراجع التى كتبتها يمكن الرجوع إليها فى المكتبات العربية أما المراجع المنشورة ولا تصل إلى الدول العربية فإنى لم أكتبها فى المراجع. وقد رتبت المراجع بطريقة حديثه وذلك حسب حداثة المرجع

وذلك لسهولة الرجوع إليها فوضعت مراجع سنة ١٩٩٤ لوحدها وسنة ١٩٩٣ لوحدها وهكذا وضمن هذه السنوات رتبت المراجع حسب الطريقة التقليدية.

فى هذا الكتاب يشعر القارئ فى كل فقرة أو موضوع أنه أمام تجربة أو بحث أو أنه يقرأ تفاصيل البحث والتجربة وكتبت تفاصيل بعض التجارب حتى يكون القارئ ملماً بالنتائج وطرق الوصول إليها. وهذه الطريقة فى كتابة الكتب العربية نادرة جداً إلا أنها شائعة ومنتشرة فى كثير من الكتب الأجنبية خاصة فى الأمراض البكتيرية والفيروسية. حاولت تطبيق هذه الطريقة فى هذا الكتاب حتى يخرج عن قضية سرد المعلومات مباشرة إلى قضية كيفية إجراء التجارب والحصول على النتائج. قد يكون هذا الأسلوب مستحباً عن النظام القديم حيث أننى قدمت للباحث منهلاً عذباً يستقى منه مباشرة طرق إجراء التجارب ومناقشة النتائج وسهولة الرجوع إلى المراجع العلمية. واستطيع أن أقول بأن كل فكرة فى هذا الكتاب هى نتيجة تجربة علمية قام بها دارس أو باحث.

وحتى يستطيع القارئ أن يستفيد من هذا الكتاب يجب أن يكون ملماً بالكيمياء الحيوية والجزيئية والهندسة الوراثية وأمراض النبات.

وأنا إذ أقدم هذا الكتاب للباحثين أو الدارسين أسجد لله شكراً الذى الهمنى الصبر وامدنى بالقوة حتى يخرج هذا الكتاب فى هذه الحالة التى هو عليها.

وأقدم أسفى واعتذارى عن كل خطأ فى هذا الكتاب لأن الكمال لله سبحانه وتعالى

«ولله الحمد من قبل ومن بعد»

المؤلف الدكتور / محمود موسى أبو عرقوب

الأول من ربيع الآخر سنة ١٤١٦ هجرية

الموافق ٢٧ أغسطس سنة ١٩٩٥م

٢٧ أب سنة ١٩٩٥م

الجزء الأول

الفيرويدات

VIROIDS

الفصل الأول

تطور علم الفيرويد

مقدمة:

إن اصطلاح فيرويد Viroid إستعمل ليدل على مجموعة من المسببات المرضية الجديدة والمميزة والتى هى أصغر من الفيرس Subviral. تتكون الفيرويدات المعروفة من وحدة قصيرة من سلسلة الحمض النووى RNA ذات وزن جزيئى يقارب ٧٥ ـ ١٠٠ ألف دالتون. عند دخول هذه الوحدات من RNA ذات الوزن الجزيئى المنخفض فى عوائل قابلة للاصابة يحدث لها تضاعف بشكل واضح وتسبب امراضاً فى العائل.

لقد ذكر اول إستعمال لكلمة فيرويد سنة ١٩٧١ وذلك أثناء المحاولات التى كانت تجرى لتنقية ومعرفة صفات العامل المسبب لمرض الدرنة المغزلية فى البطاطس والذى كان يعتقد خطأ بأنه يتسبب عن فيرس. ففى سنة ١٩٦٧ ذكر كلاً من Diener & Raymer أن المسبب المعدى لهذا المرض هو عبارة عن خيط حر من الحمض النووى RNA وأن هذه الأجزاء الفيروسية (حسب ذلك الاعتقاد) يبدو أنها لا تتواجد فى النسيج المصاب. وبعد فترة من الزمن وعند إستعمال طرق الترسيب والتحليل بالعزل الكهربائى فى الجيل، فإنه تقرر وبشكل قاطع وحاسم أن هذا الحمض المعدى من أل RNA له وزن جزيئى صغير جداً، وبالتالى فإن هذا العامل المسبب للمرض يختلف وبشكل أساسى عن الفيروسات المتعارف عليها.

بعد أن تأكد بأن مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس يتسبب عن عامل يختلف عن الفيرس ولكن كان فيه إلتباس مع الفيرس أطلق عليه العالم Diener اسم فيرويد (قريباً من لفظ فيرس). ثم بعد ذلك تبين فى سنة ١٩٧٢ و ١٩٧٣ أن هناك امراضاً أخرى مثل تقزم الاقحوان Chrysanthemum stunt ومرض اكسوكورتز الحمضيات Citrus exocortis تتسبب عن الحمض النووى RNA ذو وزن جزيئى منخفض وسميت المسببات لتلك الأمراض فيرويدات.

أدلة وجود الفيرويدات Evidence For Existance of Virods.

١ ـ الصفات الترسيبية والحساسية لأنزيم نيوكلييز:

لقد أظهرت الأبحاث المبكرة التى أجريت على المستخلص الخام من أوراق البطاطس أو الطماطم المصابة بمرض الدرنة المغزلية، أن معظم المواد المعدية تترسب على معدل بطئ جداً (Ca 10S) وأن هذه الصفة جعلت الباحثين أن يقرروا بشكل قاطع بأنه من غير المحتمل أن تكون المواد المعدية والموجودة فى العصير الخام هى أجزاء فيرس وكذلك وجد أن هذه المواد غير حساسة للمعاملة بالمذيبات العضوية المختلفة. إن جزيئات الفيرس المحتوية على دهون وذات الكثافة المنخفضة يبدو أنها غير واردة. كذلك فإن معاملة المستخلصات الخام بالفينول لا تؤثر على حيوية ولاالصفات الترسيبية لهذا العامل الممرض. واعتماداً على هذه النتائج إفترض أن هذه العوامل المسببة للمرض هى حمض نووى حر.

وجد أن تحضين المستخلص الخام مع أنزيمات النيوكلييز Nucleases أظهر أن هذه العوامل المسببة للمـرض حساسة لانزيـم Ribonuclease وغير حساسة لانزيم De + oxyribonuclease. إن الملاحظات التى استنتجت من أن العامل المرضى يمكن تركيزه وسهولة ترسيبه بالايثانول واعادل تعليقه Resuspension فى حجم صغير من منظم يكون متوافقاً مع فكرة أن هذا العامل الممرض هو حمض نووى حر.

وكذلك وجد أن تحضين المستخلصات مع أنزيم Ribonuclease فى بيئة ذات تركيز أيونى عال أظهرت أن هذا العامل الممرض يبقى حياً إلى حد ما بهذه المعاملة. إن هذه الصفة بالإضافة إلى صفة الغسل أو الازالة من أعمدة Methylated serum albumin تؤدى إلى الاقتراح بإن هذا العامل الممرض المستخلص قد يكون خيط مزدوج من الحمض RNA.

لقد إستخلص كل من Singh & Bagnall حمض نووى معدى من نسيج مصاب بفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وقارنا بعض صفات هذا الحمض مع صفات الحمض النووى الموجود فى العصارة الخام فى المستخلص، فوجدا أن العامل الممرض فى العصارة الخام (الحمض النووى RNA) له قدرة على أحداث المرض على درجة عالية من التخفيف وله درجة تثبيط عالية وكان أكثر حساسية لأنزيم Ribonuclease، عند إزالة حيوية العصارة الخام باستعمال درجة حرارة عالية أو التحضين مع أنزيم Ribonuclease يمكن أن تسترجع هذه الحيوية بالمعاملة بالفينول. وبالدراسات التى أجريت باستعمال الطرد المركزى، تبين للباحثين أنه لا يوجد حمض نووى RNA ممرض حر فى العصارة الخام ولكنهما لم يبينا مع أية مادة كان مرتبطاً.

لقد ذكرت نتائج مشابهة لتلك التى ذكرها Diener & Raymer وذلك من قبل Semancik & Weathers سنة ١٩٦٨ عندما كانا يعملان على مرض اكسوكورتز الحمضيات. وجد الباحثان أن معظم المادة الحيوية تكون موجودة فى العصارة المنقاة والمحضرة من النسيج المصاب تبقى فى المادة الطافية فى المحلول بعد إجراء عملية الطرد المركزى عالية السرعة. من هذا استنتج الباحثان أن المادة المعدية المرضية تمتلك كفاءة ترسيب حوالى ١٠ ـ S١٥. بسبب هذه النتائج وبسبب عدم إمكانية ملاحظة أجزاء فيروسية نموذجية كاملة بواسطة التصوير بالميكروسكوب الالكترونى، فقد إقترح الباحثان أن الفيرس يمكن أن يمثل شكل من أشكال الحمض النووى المعدى، قد تكون هذه الأشكال مشابهة إما لشكل غير

ثابت من فيرس خشخشة الدخان، طفرات غير متجمعة لفيرس موزايك الدخان أو كجزئ حمض نووى RNA مزدوج السلسلة.

أما الكائن الممرض الثالث الذى درس فى تلك الفترة فهو مسبب مرض تقزم الاقحوان، حيث قام بدراسته Lawson سنة ١٩٦٨ وقد ذكر الباحث أن هذا المسبب يمتلك صفات إلى حد ما مشابهة لتلك التى يتصف بها مسبب مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس ومسبب اكسوكورتز الحمضيات. وقد تميز مسبب تقزم الاقحوان بزيادة طول المادة المعدية والمسببة للمرض والتى تكورت أثناء عملية الطرد المركزى عالية السرعة. تبين أن الكائن المسبب للمرض حساس للمعاملة بأنزيم Ribonuclease ويمكن تركيزه بالترسيب بالايثانول المتبوع باعادة التعليق. إن معاملة مثل هذه التحضيرات المركزة بالفينول يؤدى إلى ظهور عينات ذات حيوية مشابهة لتلك العينات غير المعاملة.

٢ ـ غياب الفيرونات Absence of Virions :

مع أن هناك قليل من الشك بأن الترسيب البطئ لهذه المواد المعدية فى التحضيرات المأخوذة من الأنسجة المصابة بمرض الدرنة المغزلية فى البطاطس، اكسوكورتز الحمضيات وتقزم الاقحوان تكون خالية من جزيئات الحمض النووى RNA الحر، فإن السؤال الذى يخطر على البال هو هل توجد هذه الكائنات المعدية بذاتها فى مكان فى الخلية أم أنها تنطلق من أجزاء الفيرس العادى أثناء الاستخلاص؟؟. وللإجابة على هذا السؤال فقد درس مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس باسهاب كبير، فقد قرر العالم Diener سنة ١٩٧١ أن الصفات الترسيبية للمواد المعدية (سريعة الترسيب) التى توجد فى المستخلصات الخام (والتى من المحتمل أن تتكون من فايرونات) لم تتغير معنوياً بمعاملة المستخلصات الخام بالفينول فقط أو بالفينول فى وجود مركب Sodium dodecyl sulfate. هذه النتائج أدت إلى القول بعدم احتمالية أن يكون RNA مرتبطاً مع بروتين أو أن يكون موجوداً بشكل فيرون كامل أو فيرونات محطمة جزئياً. لقد تأكدت هذه النتائج عن طريق

ملاحظة أن التحضيرات النقية جداً من RNA المأخوذة من نسيج مصاب بمرض الدرنة المغزلية تحتوى أيضاً مواد معدية والتى تترسب بمعدلات أسرع من تلك المتوقع الحصول عليها من RNA حر . وإذا كانت هذه المواد المعدية سريعة الترسيب مكونة من أجزاء من بروتين نووى فيروسى فإن هذه الأجزاء يمكن أن تكون بالتالى ذات صفات غير عادية. من هذه الصفات أن غلافها البروتينى يجب أن يكون فضفاضاً بشكل كبير وكاف ليسمح بوصول أنزيم Ribonuclease (نظراً لأن نشاط وحيوية هذه المواد تكون حساسة للمعاملة بهذا الأنزيم). علاوة على ذلك وبعض من الصفات الأخرى، فإن هذه التركيبات يمكن أن تكون مقاومة للمعاملة بالفينول ومركب Sodium dodecyl sulfate .

نظراً لعدم وجود (التأكد من وجود) بروتينات نووية فى هذه الجزيئات فإن العالم Diener سنة ١٩٧١ إستنتج أن هذه المواد المعدية ذات سرعة الترسيب العالية لا يوجد فيها بروتين نووى فيروسى وبالتالى ليست أجزاء فيروسية. لقد تأكدت هذه الاستنتاجات السابقة تأكيداً جديداً بملاحظة (تجارب فى الموضع In situe) أن مسبب مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس يكون حساساً للمعاملة بأنزيم Ribonuclease. وجد أن الترشيح بالتفريغ Vacuum in filtration لعصارة الأوراق المصابة بمسبب مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس والموجود فيها أنزيم Ribonuclease يؤدى إلى الفقد الكلى إلى حد ما فى نشاط وحيوية هذا المسبب، فى حين أنه تحت هذه الظروف لا تتأثر حيوية ونشاط جزيئات الفيرس العادى.

قام العالم Zaitlin سنة ١٩٧٢ بتجربة حلل فيها بروتينات معزولة من أوراق مصابة بمسبب مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس وأوراق مصابة بفيرس موزايك الدخان، وقارن ذلك مع بروتينات معزولة من أوراق غير مصابة فوجد أنه لا دليل على وجود بروتينات فى الأوراق المصابة بمرض الدرنة المغزلية تعتبر كغطاء بروتينى لمسبب المرض فى حين أنه تحت هذه الظروف يتكون الغطاء البروتينى لسلالات فيرس موزايك الدخان ويكون واضحاً تماماً.

تساءل الباحث إذا كان الحمض النووى RNA فى المواد المعدية والتى هى سريعة الترسيب لا يقع تحت مجموعة الفيرونات فماذا عساه أن يكون؟؟. بالنظر إلى صفة سرعة التفكك بالفينول، فمن الصعوبة الاعتقاد أن معدل سرعة الترسيب لبعض المواد المعدية يكون راجعاً إلى ترافقها مع بروتين، والأكثر احتمالاً هو أن RNA يكون مرتبطاً مع مكونات خلوية فى معقدات والتى لا تتحطم بالفينول، أو أنها تتواجد فى مجموعات ذات أحجام مختلفة. وبالتالى يجب التقدم خطوة أخرى فى التعرف على هذا المسبب وذلك بتحديد موقع المسبب المرضى بالنسبة للخلايا المصابة.

٣ ـ موقع مسبب المرض فى الخلية Subcellular Location :

أجريت إختبارات حيوية على مكونات الخلية من النسيج المصاب بمرض الدرنة المغزلية فى البطاطس أظهرت أن هناك حيوية يمكن تقديرها موجودة فقط فى أجزاء من حطام الخلايا وفى الأجزاء المحتوية على الأنوية. أما البلاستيدات، الميتوكندريا، الرايبوسومات والأجزاء الذائبة فإنها لا تحتوى إلا على آثار بسيطة جداً من الحيوية (المسبب) . زيادة على ذلك عندما عزل الكروماتين من النسيج المصاب كانت هناك حيوية أكثر (وجود مسبب المرض) مرافقة لهذا الكروماتين ويمكن استخلاص مسبب المرض من هذا الكروماتين بمنظم فسفاتى وتبين أنه RNA حر.

إن هذه التجربة وتجارب أخرى أدت إلى القول بأن مسبب مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس يكون مترافقاً مع الأنوية وبشكل خاص مع الكروماتين فى الأنسجة المصابة. وجد أن المقدار المعنوى لحيوية المسبب تكون موجودة بانتظام فى حطام النسيج المحتوى على الأنوية، أما عن احتمال وجود بعض جزيئات المسبب مترافقاً مع الأغشية الخلوية لا يمكن القول بأنها تأخذ صفة اللزوم لغاية سنة ١٩٧٢ .

نظراً لأن المسبب المرضى لمرض الدرنة المغزلية فى البطاطس يكون مترافقاً مع الكروماتين، هذا يمكن أن يوضح صفاته الترسيبية المتغايرة فى المستخلص الخام.

بالاضافة لوجود جزيئات من مسبب المرض حرة، إلا أن الغالبية العظمى من جزيئات مسبب المرض تكون مترافقة مع أجزاء الكروماتين ذات الأحجام المختلفة وأن هذه الأجزاء قد تكون هى المسبب الرئيسى لصفات الترسيب السريعة للمواد المعدية المرضية.

أما التجارب التى أجريت على مسبب مرض اكسوكورتز الحمضيات أظهرت أن الحمض النووى RNA المعدى (المسبب للمرض) يكون مشابهاً لما سبقه من حيث الموقع، إذ أنه يوجد فى أنوية الخلايا المصابة ويكون وجوده مترافقاً تماماً مع الكروماتين، هذا ما قرره Sanger سنة ١٩٧٢ .

٤ ـ تقدير الوزن الجزيئى للفيرويدات المعروفة:

Molecular Weight Estimates of Native Viroids

فى أواخر الستينات أجريت محاولات كثيرة لتحديد الصفات الفيزيائية والكيميائية للفيرويدات، إلا أن هذه المحاولات وقفت أمامها عوائق كثيرة أهمها (فى تلك الفترة) أن الأحماض النووية RNAs يمكن تمييزها فقط بواسطة نشاطها الحيوى وليس اعتماداً على صفاتها الفيزيائية. إنعكست هذه العوائق بشكل خاص وبشدة على الجهود التى بذلت فى تحديد الوزن الجزيئى للأحماض النووية.

مع أنه قد عرف لبعض الوقت أن فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس يترسب بمعدل منخفض أقل من جزيئات الحمض النووى الفيروسى RNA وحيد الخيط، إلا أن هذه الملاحظة لم يمكن الاستفادة منها فى تحديد الوزن الجزيئى للفيرويد وذلك نظراً لأن التكوين البنائى لهذا الحمض لم يكن معروفاً.

لقد إستعمل العالم Loening سنة ١٩٦٧ طريقة متطورة واعتمد عليها فى امكانية تقدير الوزن الجزيئى، هذه الطريقة مبنية على النشاط الحيوى فقط. لقد إقتنع هذا العالم بأن تأثيرات التركيب الثانوى لهذا الحمض RNA على صفاته الترسيبية تكون متعاكسة مع تأثيراتها على حركتها فى الهجرة الكهربائية فى

مركب Polyacrylamide gels وبالتالى فإن دمج هاتين الطريقتين (الهجرة الكهربائية وسرعة الترسيب) سيكون ذو فائدة فى تمييز الاختلافات فى التركيب نتيجة للاختلافات فى الأوزان الجزيئية للأحماض RNAs. وذكر أنه مع أى من هذه الطرق فإن النشاط الحيوى هو المقياس الوحيد الضرورى لتقدير النتائج.

إن تطبيق هذا المبدأ على فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس أدى إلى استنتاجات غير متوقعة حيث تبين أن الحمض RNA المسبب للمرض له وزن جزيئى منخفض جداً وكان هذا التقدير حوالى ٥ × ١٠ ٤ دالتون فى نتائج معظم التجارب. هناك تأكيدات أخرى ظهرت بشكل أوضح تؤيد الوزن الجزيئى المنخفض لهذا الفيرويد، أمكن الحصول عليها من ملاحظة أن الحمض النووى RNA له القدرة على الدخول فى الجيل Gels ذو التركيز العالى من أل Polyacrylamide (يعنى ثقوب صغيرة الحجم) والتى لا تستطيع أن تمر منها الأحماض النووية ذات الوزن الجزيئى المرتفع. فى مثل هذا الجيل فإن فيرويد الدرنة المغزلية يتحرك كحزمة متماثلة محددة جيداً بمعدل هجرة يتفق مع الوزن الجزيئى المقدر سابقاً وهذا ما تم تقريره بواسطة العالم Diener سنة ١٩٧١.

أما كلاً من العالم Singh & Clark سنة ١٩٧١ فقد ذكرا بعض النتائج التى أظهرت أيضاً أن فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس هو عبارة عن RNA ذو وزن جزيئى منخفض واستنتجا من تحديد حركة الفيرويد فى الهجرة الكهربائية فى ٧,٥٪ Polyacrylamide gel أن قمة الحيوية والنشاط للفيرويد تكون متوافقة مع حجم الجزيئات ذات ٤ ـ ٥ وحدة من وحدات Svedberg.

لقد ذكر العالم Diener سنة ١٩٧٣ أن الفيرويد المسبب لمرض تقزم الاقحوان هو أيضاً حمض نووى RNA ذو وزن جزيئى منخفض، وقد استعمل فى تجاربه على هذا المرض تنقية جزيئية أكثر تطوراً عن التنقية التى استعملت فى دراسة فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس، وكانت هذه التنقية متبوعة بالترسيب والتحليل بالهجرة الكهربائية. وجد أن RNA المعدى يترسب بمعدلات تتوافق مع القيم 5 - 7.5 S، وأن عمود الهجرة الكهربائية لفيرويد تقزم الاقحوان وفيرويد الدرنة

المغزلية فى البطاطس فى ٢٠٪ polyacrylamide gels أظهرت أن الحمض النووى RNA يهاجر فى مثل هذا الجيل ويتحرك خلاله كحزمة متناسقة محددة تماماً بمعدل هجرة أكثر منه لمسبب الدرنة المغزلية فى البطاطس.

أما بالنسبة لفيرويد اكسوكورتز الحمضيات فإن الهجرة الكهربائية للتحضيرات المعدية فى ال polyacrylamide gels تدل على أن الوزن الجزيئى للحمض النووى RNA لمسبب هذا المرض هو ١,٢٥ × ١٠^٥ دالتون وإقترح أن إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية لمكوناته تتناسب مع الانتشار فى الجيل وهذا ما وجده Semancik سنة ١٩٧٢ .

كذلك فإن العالم Sanger سنة ١٩٧٢ وجد فى أبحاثه على فيرويد اكسوكورتز الحمضيات باستعمال polyacrylamide gels أن الوزن الجزيئى للحمض النووى RNA لمسبب هذا المرض هو ٥ ـ ٦ × ١٠^٤ دالتون.

مما تقـدم تبين أن الفيرويدات المعروفة حتـى ذلك الوقت سنة ١٩٧٢ عبارة عن حمض نووى RNA ذو وزن جزيئى منخفض، إلا أن هناك إنتقادات كثيرة وجهت لطريقة حساب الوزن الجزيئى لهذه الفيرويدات أهم هذه الانتقادات هى:ـ

١ ـ كانت جميع التقديرات مبنية على حركة الإنتشار الكهربائى فى polyacrylamide gels لجزيئات الحمض النووى RNA المعروفة فى ذلك الوقت، ومقارنة هذه الحركة مع RNA قياسى معروف وزنه الجزيئى. وبالتالى فإنه كلما كان الحمض النووى الفيرويدى قريب الشبه فى التركيب مع الحمض النووى القياسى كلما كانت النتائج أكثر دقة والعكس صحيح.

٢ ـ إن نتائج الدراسات التى أجريت على فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس أدت إلى الاقتراح بأن RNA الفيرويدى قد يتواجد فى تجمعات بحالات عديدة وبالتالى فإن الوزن الجزيئى المقاس بهذه الطرقة قد يكون مبنياً على هذه التجمعات وليس على الخيط المفرد الوحيد من RNA.

٣ ـ يختلف الوزن الجزيئى المقاس بهذه الطريقة وذلك حسب تركيز الجيل (له تأثير على حجم الثقوب) فوجد مثلاً أنه إذا كان تركيز الجيل أقل من ٨ ـ ١٠٪ فإن RNA موضوع الدراسة يكون ذو وزن جزيئى ١ × ١٠^٥ دالتون، بينما إذا كان التركيز للجيل أكبر من ٨ ـ ١٠٪ فإن الوزن الجزيئى لنفس الحمض موضوع الدراسة يكون ٥ × ١٠^٤ دالتون.

وبتقدم الأبحاث أمكن التغلب على مثل هذه الانتقادات كما سيذكر فى الفصول القادمة إن شاء الله.

٥ ـ التنقية Purification :

حيث أن هذه الأشياء (الفيرويدات) مجهولة وفى بداية دراستها، أصبح من الواضح أن التقدم المستمر فى معرفة صفات الفيرويدات يتطلب عزلها وتحضيرها بشكل نقى ثم يتبع ذلك تحليلات بيوكيميائية وبيوفيزيائية عادية.

إن الخطوة الأولى التى تستعمل فى تنقية فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس كما ذكرها Diener سنة ١٩٧٢، عبارة عن الحصول على الأحماض النووية من كميات كبيرة نسبياً من الأوراق المصابة والسليمة. بعد استبعاد كل من ال DNA، rRNA، tRNA والسكريات العديدة، فإن العينات المتبقية تحلل بواسطة الفصل الكهربائى فى الجيل Gels electrophoresis .

لقد ظهر فى الإختبارات الحيوية للشرائح المفردة من الجيل أن حيوية الفيرويد متوافقة مع هذا المكون الموجود فى الشريحة. هذا التوافق (المستوى العال من الحيوية) بالاضافة إلى أن هذه المادة لا تتواجد فى تحضيرات الأوراق السليمة، هذا يشكل دليلاً قوياً على أن هذه المادة الموجودة فى شرائح الجيل هى المكون الأصلى لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس.

أما بالنسبة لفيرويد اكسوكورتز الحمضيات فقد ذكر العالم Semancik ومساعدوه سنة ١٩٧٢ وسنة ١٩٧٣ أن امتصاص الأشعة فوق البنفسجية يكون

من قبل مواد موجودة فى تحضيرات من أوراق مصابة (وإن هذه المواد غير موجودة فى التحضيرات المأخوذة من الأوراق السليمة) وأن هذه المواد يمكن تعريفها بواسطة الهجرة الكهربائية فى الجيل. إن الانحراف عن هذا التوافق (قمة منحنى الامتصاص وقمة الإنتشار النشط فى الجيل) ظهر فى هذه التجربة ولكن هذه الانحرافات عزيت إلى الصعوبات التكنيكية (التقنية) الداخلة فى تقطيع وقراءة الجيل أثناء التجربة.

إن تنقية فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس بكميات كافية لكى يجرى عليها التحليلات الكيموحيوية والفيزيوحيوية حصل عليها عن طريق إخضاع التحضيرات النباتية إلى الهجرة الكهربائية فى ٢٠٪ polyacrylamide gels (مع اطالة وقت الجريان للتأكد من الفصل الكامل للحمض RNA من المكونات الطبيعية للعائل) مع ازالة أجزاء الجيل المحتوية على فيرويد الدرنة المغزلية واسترداد الحمض RNA من شرائح الجيل باستعمال طريقة Diener سنة ١٩٧٣ الداخل فيها الكروماتوغرافى Hydroxyapatite chromatography ثم رجها مع ميثوكسى إيثانول.

باستعمال التحليل بالهجرة الكهربائية للتحضيرات النهائية وجد أن هناك مكوناً واحداً فقط يمتص الأشعة فوق النفسجية، وأن هذا المكون له نفس الحركة فى الهجرة الكهربائية مثل فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس الموجود فى تحضيرات أقل تنقية، وأن هذه المادة الممتصة للأشعة فوق البنفسجية تتوافق مع نشاط الإنتشار فى الجيل.

الصفات الفيزيائية والكيميائية للفيرويد

Physical and Chemical Properties of Viroeids

١ ـ الوزن الجزيئى لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس:

Molecular Weight of PSTVd

عند توفر التحضيرات النقية من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس، فإن تحديد الوزن الجزيئى لهذا الفيرويد يكون مبنياً على، ليس على نشاطه البيولوجى، بل على

إمتصاصه للأشعة فوق البنفسجية وأصبحت هذه الطريقة ممكنة. ولتحديد الوزن الجزيئى للفيرويد، فقد ذكر العالم Boedtker سنة ١٩٧١ طريقة لذلك وقد إختار هذه الطريقة لأنها تسمح بتحديد الوزن الجزيئى للأحماض النووية RNAs بشكل منفصل عن تركيبها (ثنائى أو ثلاثى)، وبهذه الطريقة فإن الأحماض النووية RNAs يجرى لها دنترة denatured بمادة الفورمالدهيد ثم تقارن حركتها النسبية فى الانتشار الكهربائى مع حركة أجزاء مشابهة لها من حمض نووى RNA مدنتر وقياسى ومعروف وزنه الجزيئى.

لقد تم تطبيق هذه القاعدة على فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس باستعمال RNA المدنتر فى كل من الفيرس المرافق للتبقع الحلقى فى الدخان، المحول، الرايبوسوم، 5S، وفيرس تبرقش القرنفل كأوزان جزيئية قياسية، كانت النتيجة أن الوزن الجزيئى لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس يقع فى مجال (٧,٥ ـ ٨,٥) × ١٠^٤ دالتون وهذا ما ذكره Diener سنة ١٩٧٣.

إن هذا التعارض الواضح بين هذه القيمة للوزن الجزيئى والقيمة السابقة التى ذكرت بأنها ٥ × ١٠^٤ دالتون يكون أكثر احتمالاً إلى التركيب المندمج (منضغط) للحمض النووى RNA ويوضح الخطأ الحقيقى الملازم للمحاولات التى أجريت لتقدير الوزن الجزيئى للفيرويدات بالهجرة الكهربائية فى الجيل بالمقارنة للجزيئات المعروفة.

٢ ـ الدنترة الحرارية لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس:

Thermal Denaturation of PSTVd

لتحديد فيما إذا كان فيرويد الدرنة المغزلية احادى أو ثنائى الخيط، درست الدنترة الحرارية للحمض النووى RNA وكان منحنى الدنترة يدل على أن تركيب الفيرويد ليس مزدوج القواعد بانتظام مثل RNA مزدوج الخيط، وبالتالى فإنه فى هذه الحالة

فمن المتوقع أن تحدث الدنترة على معدل درجات حرارة أكثر تقارباً وذات قيمة عالية. وعلى أيه حال فإن منحنى الدنترة لا يقرر بأن جزئ RNA احادى الخيط ذو قواعد مزدوجة بدون إنتظام مثل RNA المحول الذى فيه مناطق احادية الخيط تتبادل مع مناطق مزدوجة الخيط.

إن تحديد صفات الدنترة الحرارية لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس المذاب فى منظم قوى عالى الايونية (0.1 x SSC) قد أكد الاستنتاجات السابقة وهى أن الدنترة تحدث على معدل عال من درجات الحرارة. ولقد وجد Diener سنة ١٩٧٣ أنه تحت هذه الظروف فإن درجة حرارة الدنترة تقارب ٥٤°م.

٣ ـ الحساسية للاشعاع Radiation Sensitivity :

بعد أن تبين أن فيرويد الدرنة المغزلية ذو وزن جزيئى منخفض، كان هناك اهتماماً فى تحديد حساسيته للاشعاع بواسطة الاشعة فوق البنفسجية، مع أن الباحث يمكن أن يتوقع أن الوزن الجزيئى المنخفض (كما فى هذا الفيرويد) سيكون أكثر حساسية للاشعاع بواسطة الاشعة فوق البنفسجية من الاحماض RNA أو DNA الفيروسية ذات الحجم الأكبر بشكل واضح، إلا أن تأثير الحجم على الحساسية بالأشعة فوق البنفسجية فى الأحماض النووية لم يتوضح تماماً حتى سنة ١٩٧٠.

إن تعريض الحمض النووى RNA الموجود فى كل من فيرويد الدرنة المغزلية، فيرس البقعة الحلقية فى الدخان والفيروسات المرافقة، للأشعة فوق البنفسجية ٢٥٤ نانوميتر أظهر أن التثبيط حصل بنسبة ٧٠ ـ ٩٠ ضعف فى فيرويد الدرنة المغزلية والفيروسات المرافقة بالمقارنة مع فيرس البقعة الحلقية فى الدخان، هذا ما وجده Diener سنة ١٩٧٤. هذه النتائج ذات الاختلاف الواضح فى الحساسية للاشعاع بالاشعة فوق البنفسجية يكون تفسيرها بسبب الحجم الصغير للحمض RNA فى

فيرويد الدرنة المغزلية والفيروسات المرافقة إذا ما قورنت بحجم RNA فى فيرس البقعة الحلقية فى الدخان.

لقد قام العالم Semancik سنة ١٩٧٣ بتعريض تحضيرات من فيرويد اكسوكورتز الحمضيات وفيرس موزايك الدخان إلى أشعة مؤينة، وحدد بالمعدلات المقارنة للتثبيط البيولوجى، الوزن الجزيئى فوجد أنه ١,١ × ١٠^٥ دالتون للحجم المحدد من فيرويد اكسوكورتز الحمضيات.

٤ ـ الفحص بالميكروسكوب الالكترونى لفيرويد الدرنة المغزلية:

Electron Microscopy of PSTVd

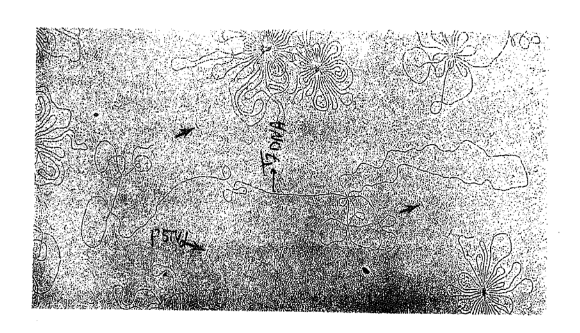
إستعمل العالم Sogo ومرافقوه سنة ١٩٧٣ طريقة لدراسة فيرويد الدرنة المغزلية بالميكروسكوب الالكترونى، فقد عامل تحضيرات نقية من فيرويد الدرنة المغزلية بطبقة احادية من البروتين واستعمل الطريقة التى ذكرها Zahn و Kleinschmidt سنة ١٩٥٩.

عند رش تحضيرات من فيرويد الدرنة المغزلية الموجودة فى ٤ مول من محلول أسيتات الصوديوم على الصورة تحت المائية للماء المقطر، تكشفت تركيبات قصيرة جداً غالباً فى تجمعات منضغطة ولكن احياناً على شكل أجزاء منفصلة، هذه الأجزاء لم يمكن اكتشافها فى حالة الكنترول لأحماض نووية حرة وكانت غير موجودة فى التحضيرات المعاملة بأنزيم Ribonuclease.

بسبب إتحاد جزيئات فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس فى تجمعات كان من الصعب وضع تصورات عن طول وتركيب الجزئ، بناء على ذلك فإن الطرق التى يكون بمقدورها تفكيك التجمعات وتجعل هناك امكانية رؤية جزيئات فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس بمفرده قد وضعت تحت الإختبار. وبالفعل كان هناك اعداداً كثيرة من السلاسل القصيرة ذات طول متناسق نسبياً لوحظت عندما نشرت تحضيرات من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس فى محلول يوريا ٨ مول، هذا ماوجده Sogo ومرافقوه سنة ١٩٧٣. لم يمكن تمييز وملاحظة مثل تلك

السلاسل فى عينات الكنترول أو بعد المعاملة بأنزيم Ribonuclease . كان متوسط الطول لهذه الجزيئات حوالى ٥٠٠ أنجستروم.

نظراً لأن الكتلة لكل وحدة طول غير معروفة، فإن أطوال جزيئات فيرويد الدرنة المغزلية للبطاطس كانت تقارن مع تلك الجزيئات من الأحماض النووية معروفة الوزن الجزيئى التى كانت تضاف إلى تحضيرات الفيرويد وكانت عندئذ تعامل بالتطابق بين المعلوم والمجهول.



شكل رقم ١ :
صورة الكترونية ليفرويد PSTVd مختلطاً مع DNAثنائى الخيط و DNA للفاج T_7 بالمقارنة النسبية يلاحظ الحجم الصغير جداً للفيرويد بالمقارنة مع DNA للفاج.

يظهر شكل ١ صورة ميكروسكوبيه لمخلوط من حمض DNA ثنائى الخيط، Coliphage T_7 و RNA لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس. تدل القياسات أن DNA للفاج T - 7 حوالى ٢٨٠ ضعف طول فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس، يظهر كذلك أن سمك فيرويد الدرنة المغزلية مشابهاً لسمك DNA للفاج T - 7. واعتماداً على أن الوزن الجزيئى للحمض T_7 - DNA يساوى ٢٥ × ١٠^٦ دالتون كما ذكر العالم Lang سنة ١٩٧٠ فإن الوزن الجزيئى لفيرويد الدرنة المغزلية هو ٨,٩ × ١٠^٤ دالتون.

إن الفحص الميكروسكوبى لخليط من فيرويد الدرنة المغزلية وحمض RNA لفيرس تبرقش القرنفل مدنتر بالفورمالدهيد أظهر أن RNA الفيرويدى أسمك من الخيط المفرد من RNA الفيروسى، إلا أن طول RNA الفيروسى حوالى ١٧ ضعف طول RNA الفيرويدى المدنتر. هذه المقارنة ادت إلى تقدير الوزن الجزيئى للفيرويد بحوالى ٧,٩ × ١٠^٤ دالتون.

إن تقديرات الوزن الجزيئى (للفيرويد) المتحصل عليها بواسطة الميكروسكوب الالكترونى تكون بالتالى متوافقة تماماً مع القيم المتحصل عليها من تحليل الفيرويد المدنتر بالحرارة أو بالفورمالين والمستعمل فى polyacrylamide gels.

٥ - تركيب جزئ الفيرويد Molecular Srtucture of Viroid

مع أن الوزن الجزيئى المنخفض للفيرويدات قد تحدد نهائياً، إلا أن الاختلاف فيما يتعلق بالتركيب الدقيق لجزيئاتها لم يكن واضحاً بشكل جيد فى ضوء المعلومات فى أوائل السبعينات. فى بعض الأنظمة التحليلية فإن الفيرويدات تظهر صفات نموذجية لصفات الحمض RNA ثنائى الخيط، وفى أنظمة أخرى تظهر صفات RNA أحادى الخيط.

إن نظام الازالة المتبع مع فيرويد الدرنة المغزلية من أعمدة Methylated serum al-bumin أدت إلى القول بأن حمض ال RNA الفيرويدى هو ثنائى الخيط، بينما

طرق الازالة من أعمدة CF - II cellulose أظهرت بأن الحمض RNA يتألف من جزيئات ثنائية السلسلة وجزيئات أحادية السلسلة. إن هذه النتائج المتضاربة قدم لها العالم Engelhardt سنة ١٩٧٢ تفسيراً وذلك بأن أظهر أن إمتداد أو طول التركيب الثانوى للحمض RNA تمتلك تأثيراً عميقاً على طرق إزالته من مثل هذه الأعمدة. لقد وجد أنه كلما زادت كمية التركيبات الثانوية للحمض RNA فى وقت الاضافة للعمود، كلما زادت القطع أو الأجزاء التى سوف تزال فى منظم Ethanol - free هذه تعنى أن الازالة التى كانت تحدث اولاً كانت تؤدى إلى الاعتقاد بأنه يتكون من حمض RNA ثنائى السلسلة فقط. بالاحتكام إلى هذا المعيار فإن فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس له تركيبات ثانوية عديدة.

من ناحية أخرى فإن إستعمال Hydroxyapatite فإن فيريود الدرنة المغزلية يزال غالباً بمنظم فسفاتى تركيزه أكثر إنخفاضاً من ما هو متوقع لو كان الحمض ثنائى السلسلة. كما أن بعض الأجزاء من الفيرويد تزال على تركيزات أعلى من المنظم.

أما إختبارات المناعة التى أجريت مع السيرم المضاد والذى يتفاعل بشكل خاص مع RNA ثنائى السلسلة لم يعط أية دلالة لوجود RNA ثنائى السلسلة فى التحضيرات عالية الإصابة من الفيرويد. إن الدنترة بالحرارة، الفيرويد المعامل بالفورمالين، على أية حال، كان يتبين أنه يتكون من مركبين لهما حركة مختلفة إلى حد ما فى الهجرة الكهربائية.

أما فيما يتعلق بفيرويد اكسوكورتز الحمضيات فإن العالمان Semancik & Weathers سنة ١٩٧٠ ذكرا بأن الحمض النووى RNA المعدى يتواجد على شكلين. الشكل الأول يترسب فى مجال (15S - 10) أما الشكل الثانى يترسب فوق S25. وجد أن ازالة فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وفيرويد اكسوكورتز الحمضيات من أعمدة Methylated serum albumin يكون فى مجال إزالة الحمض DNA من العائل ولكن لا يشابهما عند الازالة من أعمدة سليولوزية باستعمال منظم إيثانول حر فقط. مع أن هذه الصفات منسجمة مع صفات

الحمض ثنائى السلسلة، إلا أن هناك محاولات أجريت لتفكيك هذا الحمض RNA المتوقع أنه ثنائى السلسلة أو ملاحظة أية مقاومة يبديها لأنزيم Ribonuclease فى وسط أيونى عال، وكل هذه المحاولات لم تنجح. أخيراً إتجه الباحثون إلى عملية فصل السلاسل بالحرارة وسرعة التبريد، وخلصوا إلى نتيجة بأن RNA مقاوم جزئياً عند تحضينه مع مادة Diethylpyrophosphate عندئذ ظهرت نتائج مشابهة لفيرويد الدرنة المغزلية والتى ذكرها Sing & Clark سنة ١٩٧١ وإقترحا بأن تركيب RNA الفيرويدى هو على الأقل ثنائى السلسلة جزئياً. أما بالنسبة لفيرويد اكسوكورتز الحمضيات تثبط كلية بمادة الفورمالدهيد.

عند مقارنة RNA الفيرويدى مع RNA الفيروسى وحيد السلسلة، تبين أن فيرويد اكسوكورتز الحمضيات مقاوم للتثبيط بالحرارة وبأنزيمات القطع الخارجى Exonucleases وفى هذه الصفة الأخيرة يشارك RNA الفيرويدى للحمضيات فيرويد الدرنة المغزلية، إلا أن المقاومة للتثبيط بأنزيمات اكسوكورتز أنزيمات القطع الخارجى Exonucleases قد تؤدى إلى القول بأن تركيب RNA الفيرويدى يكون دائرياً، وهذا ما قرره Diener سنة ١٩٧١ والعالم Semancik سنة ١٩٧٠ ، إلا أن درجة المقاومة هذه أدت إلى زيادة الأبحاث فى هذا المجال.

واعتماداً على مبدأ الكثافة المنخفضة والتى تجعل الحمض النووى RNA الفيرويدى عائماً فى محلول متدرج الكثافة من محلول كبريتات السيزيوم القياسى، فإن بعض العلماء إقترحوا أن فيرويد اكسوكورتز الحمضيات إما أن يكون حمض نووى منخفض الوزن الجزيئى أو RNA ناقل يشبه mRNA أو جزئ هجين- RNA DNA، ولكن تبين لهم فيما بعد أن مدة الترسيب غير كافية للحصول على أحماض نووية متوازنة منخفضة الوزن الجزيئى من RNA.

وبكلمة موجزة يمكن تلخيص أبحاث العلماء على تركيب جزئ الفيرويد بأنه اما:ــ

١ ــ أن يكون عبارة عن حمض نووى احادى السلسلة من RNA مع وجود بعض التركيبات مثل تركيب دبوس الشعر تكون ذات قواعد مزدوجة.

٢ ـ أن يكون الفيرويد حمض نووى RNA ثنائى السلسلة ولكن بجزيئات غير كاملة ازدواج القواعد.

الصفات الحيوية

BIOLOGICAL PROPERTIES

١ ـ التضاعف (التناسخ) Replication

إن إنخفاض الوزن الجزيئى للفيرويدات أثار تساؤلاً، وهو إلى أى مدى تستطيع هذه الأحماض النووية RNAs أن تمتلك معلومات وراثية كافية لتحث على تضاعفها فى العوائل القابلة للإصابة. إن الوزن الجزيئى لفيرويد الدرنة المغزلية يكون كافياً فقط لعمل شفرة لـ ٧٠ ـ ٨٠ حمض أمينى، هذا يعنى أنه لا يكاد يستطيع أن يشفر إلا لمقدار صغير من البروتين، ولكن لا يستطيع أن يشفر إلى تحت وحدة خاصة لعمل أنزيم RNA - polymerase (للتضاعف) بحجم يمكن مقارنته مع تلك الوحدات المعروفة فى التضاعف.

وعلى كل حال فإن ما يمكن تصوره هو أن فيرويد الدرنة المغزلية ليس نوعاً من الجزيئات المفردة ولكن إلى حد ما عبارة عن تجمعات من جزيئات RNA عديدة متشابهة فى الطول بترتيب نيوكليتيدات مختلف والتى مع بعضها يمكن أن تشكل جينوم فيروسى بحجم عادى تقريباً. هناك بعض إنتقادات وجهت إلى هذا الرأى.

ربما يكون بناء الفيرويدات بطاقة عادية من جينوم العائل والتى تبدأ نشاطها بوجود الفيرويد فى العائل، إلا أنها تكون مكبوتة كلية فى النباتات غير المصابة. إذا كان ذلك صحيحاً فإن الفيرويدات تعمل كمانعات كبت لهذه الطاقة الكامنة، إما مباشرة أو عن طريق ببتيدات عديدة مترجمة من الحمض النووى RNA. إن مثل هذا التصور يجلب سؤالاً هو لماذا قطع حمـض ال DNA المكبوتة كلية والتى تحتوى معلومات وراثية غير مرغوبة للكائن الحى يجـب أن يحافـظ عليها أثناء النمو والتطـور؟؟. أيضاً فإن الباحث يجـب أن يتوقع أن الكبح الذاتى لقطع حمض

ال DNA أحياناً يمكن أن تحدث. وهذه الأسئلة بقيت بدون جواب حتى منتصف السبعينات.

إن الأكثر معقولية من الوهلة الأولى هو إفتراض أن فيرويد الدرنة المغزلية مشابهاً للحمض RNA فى الفيروسات المرافقة والتى تتطلب فيرس مساعد لها لتضاعف نفسها. إن الجهود التى بذلت لاثبات وجود مثل هذا الفيرس المساعد فى نباتات الطماطم غير المحقونة أعطى نتائج سلبية. ولقد أظهر العلماء أنه إذا كان مثل هذا الفيرس موجوداً فيجب أن ينتقل رأسياً خلال البذور إلى أى وحدة تكاثرية أخرى فى النبات. وكما هو معروف فإن إنتقال فيروسات النبات عن طريق البذور بمعدلات كبيرة هو فى الواقع نسبة بسيطة جداً. نظراً لأن فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس عنده القدرة على التناسخ فى عدد من أنواع نباتات العائلة الباذنجانية بالإضافة إلى البطاطس والطماطم، فبالتالى يجب أن يتكاثر الفيرس المرافق والمفترض وجوده مع الفيرويد فى هذه الأنواع النباتية أيضاً. لقد أظهر Diener سنة ١٩٧٢ أن أنواع نباتات العائلة الباذنجانية والتى يمكن أن تصاب عن طريق مستخلص خام يحتوى على فيرويد الدرنة المغزلية يمكن أن تصلب أيضاً بحمض RNA ذو وزن جزيئى منخفض مفصولاً من polyacrylamide gels. وبالتالى إذا كانت الفيروسات المساعدة داخلة فى تضاعف فيرويد الدرنة المغزلية فإن مثل هذه الفيروسات يجب أن تكون موجودة بشكل عام فى النباتات التى تبدو سليمة من أنواع نباتات العائلة الباذنجانية.

من تلك النتائج ومن غيرها يبدو من غير المحتمل وجود فيروسات مساعدة مع الفيرويد، وبالتالى فإن فيرويد الدرنة المغزلية بالرغم من حجمه الصغير يبدو أنه ذو مقدرة على التضاعف تلقائياً بذاته فى النباتات العائل.

٢ - نشوء المرض Pathogenesis

نظراً للكمية الصغيرة من المعلومات الوراثية التى تدخلها الفيرويدات فى خلايا عوائلها، فإنه من المدهش أنه (فى بعض العوائل) يمكن لبعض الفيرويدات أن

تحدث أمراضاً خطيرة بأعراض متنوعة مشابهة لتلك الأعراض النموذجية المتسببة عن الاصابة الفيروسية. نظراً لأن هناك كمية صغيرة جداً من الفيرويدات المعروفة تكون موجودة فى الأنسجة المصابة، فإنه من غير المحتمل أن يكون هناك نقصاً فى النيوكليتيدات المتوفرة لبناء الحمض النووى للعائل وتكون مسئولة عن هذه الاضطرابات فى العائل. لقد تأكد هذا الرأى بحقيقة أنه فى كثير من العوائل فإن الفيرويدات تتضاعف بكفاءة عالية بدون حدوث اضراراً ظاهرة للعائل، هذا ما ذكره Sanger سنة ١٩٧٢.

هناك عدة اراء تفسر دور الفيرويدات فى نشوء المرض منها: -

١ - هناك تدخلاً نوعياً من قبل الفيرويدات يحدث فى وظائف ميتابولزم العائل مما يؤدى إلى حدوث الأمراض.

٢ - يمكن أن تعمل الفيرويدات، مثلا، كأحماض نووية RNAs ناقلة غير عادية وهذا يؤدى إلى تكوين أو بناء بروتينات ذات عيوب تركيبية.

٣ - يمكن أن تتدخل الفيرويدات مع جينوم العائل من ناحية نسخ الجينوم إما بالكبح العادى للسسترونات Cistrons المعبرة أو عن طريق وقف الكبح للسسترونات المثبطة عادياً.

٤ - يمكن أن يكون التداخل إختيارياً عن طريق عديدات الببتين المترجمة عن RNA الفيرويد. بناءً على ما تقدم وبسبب محتويات الفيرويدات من المعلومات المحدودة وراثياً، فإن هذه الفيرويدات يمكن أن تكون موديلات أنظمة نافعة للجهود المبذولة فى شرح الميكانيكية البيوكيميائية لنشوء المرض على مستوى الجزئ.

٣ - الإنتقال Transmission

إن الفيرويدات المعروفة لغاية سنة ١٩٧٣ تنتقل بالطرق الميكانيكية، إما بسهولة مثل فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وفيرويد تقزم الاقحوان، وإما بصعوبة إلى حد

ما مثل فيرويد اكسوكورتز الحمضيات. بالنسبة لفيرويد الدرنة المغزلية فإن الانتقال الميكانيكى يكون المسئول الرئيسى عن إنتشار المرض فى الطبيعة، هذا ما قرره Dien-er سنة ١٩٧١ . ونظراً لغياب الغطاء الواقى البروتينى فإن مدة بقاء ال RNA حياً خلال عملية الانتقال من الصعوبة بمكان فهمها حتى أصبح من الواضح تماماً أن فيرويد الدرنة المغزلية وفيرويد اكسوكورتز الحمضيات يكونان موجودان ضمن الأنوية فى الخلايا المصابة، حيث فى هذه الحالة يكونان محميان جيداً من المهاجمة الانزيمية، هذا ما وجده العالم Sanger سنة ١٩٧٢ . من المحتمل أثناء الإنتقال الطبيعى أن أجزاءً من الأنوية المحتوية على فيرويد الدرنة المغزلية أو قطعاً من الكروماتين المحتوية على فيرويد الدرنة المغزلية تنتقل من الخلايا المصابة إلى الخلايا العادية بطريقة أفضل من إنتقال ال RNA الحر. إن فيرويد الدرنة المغزلية ينتقل عمودياً إما خلال حبة اللقاح أو المبايض فى نباتات الطماطم والبطاطس المصابة، وإن هذا الانتقال العمودى يحدث بمعدل يختلف من صفر إلى ١٠٠ ٪ معتمداً على اختبارات الجمع الفردية.

أصل الفيرويدات Viroids Origin

هناك تساؤل عن أصل الفيرويدات. هل الفيرويدات تنتمى إلى الفيروسات أو أنها تنتمى إلى الأحماض النووية الخلوية RNAs ؟؟.

فى الوقت الذى ظهر فيه مفهوم الفيرويد حدث تقدم سريع فى هذا النوع من الدراسة فكان من المعقول فى البداية أن ينظر إلى الفيرويد بأنه ذو قرابة مع الفيروسات العادية وإقترح بأنه إما أن يكون شكل بدائى جداً للفيرس أو أنه نشأ عن الفيروسات بطريقة معينة (مثل التفكك) بحيث تكون النتيجة هى الفيرويد النموذجى. بعد ذلك فإن المعلومات التى تجمعت عن الفيرويدات قد جعلت كل الباحثين تتخلى عن هذه الأفكار بتزايد مستمر.

هناك عدة اراء عن أصل الفيرويدات قد لخصها العالم Diener سنة ١٩٧٩ . ثم

ناقشها واوضح كثير منها واضاف عليها العالم Sanger سنة ١٩٨٤. من هذه الأراء.

١ - إن أهم الملاحظات فيما يتعلق بأصل الفيرويدات يختص باكتشافها:

وهذا يمكن توضيحه بحقيقة أن كل الأمراض الفيرويدية قد أمكن التعرف عليها خلال هذا القرن، فى حين أن بعضاً منها اكتشف حديثاً. وهذا بجملته يختلف عن أمراض النبات المتسببة عن الفيروسات العادية حيث أن كثيراً منها لوحظ فى القرن التاسع عشر وإن أول الأمراض الفيروسية قد اكتشف فى هولندا فى القرن السابع عشر. أما بالنسبة للأمراض المتسببة عن فيرويدات مثل فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وفيرويد اكسوكورتز الحمضيات كانت أولى الملاحظات لهما فى أوائل العشرينات من هذا القرن، بينما مرض تقزم حشيشة الدينار الفيرويدى، وفيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار كان أول وصف لهما فى الفترة من ١٩٦٣ ـ ١٩٧٠ واستمر لغاية ١٩٧٤. وبشكل خاص تدل البيانات أن المرض المتسبب عن فيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار كانت أول ملاحظة له فى صوبة زجاجية مفردة ثم إنتشر منها، بينما مرض كادانخ ـ كادانخ فى جوز الهند أول ذكر له كان عند ظهوره فى جزيرة صغيرة فى الفلبين.

من كل ما سبق يتبين أن الفيرويدات حديثة الأصل، وقد إفترض أنها نشأت من نشاطات الانسان مثل ادخال الزراعات الاحادية Monocultures حيث أنها قد تكون ساهمت فى تكاثر وإنتشار الفيرويدات والأمراض الفيرويدية. ونظراً لأن الفيرويدات غالباً لا تسبب اعراضاً فى النباتات البرية، بالتالى إفترض بأنها نشأت من عائل نباتى برى غير معروف لم تكن ممرضه عليه، ثم بعد ذلك إنتقلت إلى نباتات مزروعة حساسة بواسطة التطعيم أو بالمصادفة وهذا يكون باعثاً على تكوين RNA متناسخ وممرض وهو الفيرويد.

٢ - نشوء الفيرويد بالمصادفة من أحماض نووية RNAsعادية:

هذا الاقتراح الثانى لاصل الفيرويدات يذكر أن الفيرويد قد نشأ بالمصادفة المحضة فى الطبيعة من أحماض نووية RNAs عادية منتظمة فى النباتات المزروعة طبيعياً أو فى النباتات البرية وتحول إلى تركيبات عالية الثبات وذات كفاءة على التناسخ الذاتى وذات قدرة على الحركة داخل وبين الخلايا. واعتماداً على ذلك فإن العالم Diener قد تنبأ بأن أمراض فيرويدية جديدة على النباتات المزروعة سوف تستمر فى التكشف والظهور بشكل غير متوقع.

إن الأحماض النووية RNAs ذات الأوزان الجزيئية المنخفضة بالإضافة إلى mRNA وإلى rRNA ذوات 5S تتواجد فى الخلايا العادية بشكل خاص فى الأنوية والنويات وتكون مترافقة مع الكروماتين. بالرغم من أن وظيفة هذه الأحماض غير معروفة، إلا أنه كان هناك إقتراحاً بأن بعض RNAs فى النواة قد يكون لها دوراً فى تنظيم بعض وظائف النواة وتتدخل أيضاً فى تنظيم نسخ RNA من الجينوم. كذلك وجد أن بناء RNA فى نظام الخلية الحر بواسطة أنزيم Polymerase بكتيريا E. coli باعتبار الكروماتين قالب شجعت بإضافة RNA كروماتينى ذو الوزن الجزيئى المنخفض بينما (فى حالة DNA كقالب) فإن بناء RNA كان يثبط بإضافة مثل هذا الحمض RNA.

إن فيرويد الدرنة المغزلية المتصور والذى يكون مرافقاً للكروماتين والذى يكون فى نفس مجال الوزن الجزيئى يمكن أن يكون متعلقاً ببعض الأحماض النووية RNAs فى النواة والنوية. وبالتالى فإن الباحث قد يتأمل فى أن فيرويد الدرنة المغزلية، ومن المحتمل فيرويدات أخرى نشأت من RNAs من النواة والتى تكون مكونات عادية للكائن والتى تكون أيضاً أساسية لتكشفه. إن تحول RNA من مكون عادى فى الخلية إلى مسبب مرضى ممكن أن يحدث إما بواسطة طفرة أو بواسطة دخوله مصادفة فى نوع غريب والذى يتناسخ فيه هذا ال RNA. فى أى من الحالتين فإن المرض سيكون هو نتيجة التداخل مع الوظائف العادية للأحماض RNAs فى النواة.

٣ - حدوث تداخل فى تتابع النيوكليتيدات فى الحمض النووى RNA:

قد تكون الفيرويدات نشأت من حدوث تداخل فى تتابع النيوكليتيدات فى الحمض النووى RNA. هذا الافتراض يبدو أنه مدعماً بتماثل التتابع بين معظم تنوعات التتابع وتتابعات الفيرويدات (باستثناء فيرويد ضربة الشمس فى الافوكادو) والنهاية `5 للحمض U1 RNA، حمض نووى صغير RNA يعتقد بأنه يدخل فى عملية التراكب للحمض mRNA.

عندما اكتشفت الجينات المنشقة Split genes فى الكائنات مميزة النواة وتراكب RNA (عملية التراكب تشبه القص واللصق وتتم بواسطة معقد اسمه Spliceosome)، عندئذ إقترح بأن الفيرويدات من الممكن أن تكون قد نشأت بواسطة الانترونات Introns. يمكن تعريف الانترونات بأنها التتابعات التى توجد فى DNA مميزة النواة ولكنها تحذف من mRNA أثناء تجهيزه بحيث يصل إلى الطور الناضج خال منها.

يستطيع الباحث أن يتأمل بأن مثل هذه التتابعات يمكن أن تتيح الفرصة لكثير من الجزيئات الوسيطة ذات القواعد المزدوجة (كما تفعل الفيرويدات)، وإذا ما أصبحت دائرية (كما هى الفيرويدات) وبالتالى فإن هذه الجزيئات تصبح ثابتة وتنجو من التحطيم. إن إتخاذ الانترونات للشكل الدائرى قد لوحظ فى دراسات Borst سنة ١٩٨١ وذكر أن بعضاً منها تأخذ حجم الفيرويدات تقريباً. والذى يمكن تصوره أن مثل هذه الانترونات يمكن أن تشكل تتابع ملائم مميز ويمكن أن تنسخ بواسطة أنزيم العائل القادر على العمل كأنزيم RNA polyme-rase للحمض RNA الموجه وبالتالى تنجو من ميكانيكية التوجيه فى خلية العائل.

إن الأحماض النووية الصغيرة من RNA المترافقة مع أجزاء من رايبونيوكلو بروتين يعتقد بأنها داخلة فى علمية النسخ الأولية لمنتجات الجينات المنشقة. إن النهاية رقم `5 من حمض نووى مثل RNA U1 قد تبين بأنه يسلك كمكمل مع

نهايات الانترونات، ومن المعتقد أن هذا يعطى ميكانيكية تؤكد الاصلاح بالحذف لتتابع الانترون ودقة ارتباط تتابع التشفير.

مع أن التركيب الأولى للأحماض النووية الصغيرة SnRNA's غير مؤكد تماماً، إلا أن الدراسات الحديثة للجين المنشق فى أنواع النباتات الراقية ومثيلاتها من تتابع أطراف إنترون ـ إكسون مع تلك التى فى مميزة النواة، أدت إلى الاقتراح بان SnRNA مماثل لـ RNA U1 الموجود فى النباتات الراقية وأن تتابع النهاية 5` مشابهة لـ U1RNA. وإذا كان هذا صحيحاً فإن نظرية الانترون لاصل الفيرويد تتنبأ أن تتابع نيوكليتيدى معين على الفيرويدات أن تسلكه كمكمل للنهاية 5` لهذا الحمض النووى الصغير المزعوم SnRNA بالإضافة إلى U1RNA.

ومن ناحية هذه التشابهات كان من الأفضل تحديد فيما إذا كانت تتابعات النيوكليتيدات فى فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس تحتوى على مطاطية كافية لتكوين تكامل مع النهاية 5` للحمض U1RNA أو لا تحتوى، ولكن الأستقصاء عن مثل هذه التتابعات فشل فى الكشف عن امكانية تكوين معقدات ثابتة بين RNA لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وU1RNA. وعلى أية حال لأن RNA الفيرويدى فى البطاطس يبدو بأنه ينسخ عن قالب RNA، فإن الخيط الكامل وليس الفيرويد نفسه يمكن أن يمثل إنترون ثابت ويسلك سلوك تكميلى مع U1RNA.

٤ ـ احتمالية نشوء الفيرويدات من الفيروسايدات Virusoids :

يمكن أن تكون الفيرويدات قد نشأت من الفيروسايدات وهى أحماض نووية RNAs دائرية صغيرة مغلفة فى بعض الفيروسات النباتية بجينوم ثنائى الشق dipartite. إن الاختلافات الاساسية بين الفيرويد والفيروسايد virusoid يبدو أنه فى كون الفيرويد يتناسخ بواسطة أنزيم العائل polymerase، بينما الفيروسايد يعتمد على أنزيم Replicase الفيروسى لتناسخه. وتختلف الفيرويدات عن الفيروسايدات فى النقاط الآتية: ـ

أ ـ لا يوجد تماثل فى التتابع يمكن تقديره بين الفيرويدات والفيروسايدات.

ب ـ تختلف الفيروسايدات عن الفيرويدات فى الصفات الثيرموديناميكية والهيدروديناميكية وهى بهذه الصفات تتشابه جداً مع التتابع العشوائى ومع طول وتركيب القاعدة ودائرية الفيرويدات.

٥ ـ يمكن أن تكون الفيرويدات قد نشأت من نظام تبادل المعلومات الوراثية بين خلايا مميزة النواة وعضيات الخلية:

يمكن أن تكون الفيرويدات والحمض RNA الفيروسى قد نشأت من نظام تبادل المعلومات الوراثية بين خلايا مميزة النواة وعضيات الخلية. هذا الاعتقاد متوقع جداً وهو يفترض أن الفيرويدات قادرة على إصابة النبات جهازياً ويمكنها أن تعتمد على ميكانزم العائل فى الانتقال داخل الخلايا والتضاعف بسبب أن خلايا العائل (النبات) العادية تحتوى تركيبات لها صلة مع الأحماض RNAs والتى هى أيضاً قادرة على الانتقال والتضاعف لكى تسهل تكبيرها و-Extrachromosomal inheri-tance ومن الواضح أن مثل هذا النظام إذا وجد يمكن أن يكون مصدراً لتطور الفيرويدات وحمض RNA الفيروسى.

٦ ـ يمكن أن تكون الفيرويدات نشأت من كائنات أولية النواة:

لقد إفترض أن الفيرويدات نشأت من الحمض النووى RNA فى الكائنات أولية النواة عن طريق اصابة النباتات الراقية بواسطة كائنات غير مميزة النواة. بنى هذا الافتراض على ما وجد من أنه ليس فقط RNA polymerase فى مميزة النواة ولكن أيضاً أنزيمات RNA and DNA - Polymerase من البكتريا **E. coli** قادرة على نسخ RNA الفيرويدى فى المعمل إلى نسخ مكملة من RNA وDNA. وعلى أية حال فإن التتابع المتعلق بالفيرويد لغاية الآن لم يمكن اكتشافه فى أولية النواة.

٧ - يمكن أن تكون الفيرويدات إشتقت من عناصر وراثية مترجمة:

يمكن أن تكون الفيرويدات قد إشتقت من عناصر وراثية مترجمة Transposable genetic elements . لقد ذكر Kiefer et al سنة ١٩٨٣ أن تركيبات الفيرويد تحتوى تتابعات مشابهة لتلك الحادثة فى نهايات بعض العناصر الوراثية القابلة للتحرك وكل من Retroviral - proviruses شاملة وجود التكرار المعكوس الذى يكون غالباً منتهياً بثنائية النيوكليتيدة U - G و C - A مطوقاً بشكل غير كامل مباشرة التكرار ومطاطية طويلة من البيورين موجودة فى كثير من الفيرويدات والتى تشابه التتابع التمهيدى لانزيم النسخ العكسى للخيط الموجب فى بناء DNA لـ Retroviral proviruses . وبالتالى يمكن القول بأن الفيرويدات نشأت من العناصر القابلة للانتقال أو Retroviral proviruses عن طريق ازالة معظم المناطق الداخلية بالإضافة إلى التدخل فى تتابعات العائل.

إن تماثل التتابع لأكثر من ٧٠٪ من فيرويدات مجموعة PSTVd (فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس) يمكن أن يدل على أن اصولها من جد واحد أو (هذا أكثر احتمالاً) أن نشوءها فى مناطق جغرافية. متفرقة يدل على أنها نشأت من جدود مختلفة من RNA. ونظراً لأن تتابع الفيرويد لا يحدث فى DNA العائل يستبعد أن تكون الفيرويدات من أصل RNA ناتج من DNA. ونظراً لأن التتابع المتماثل مع U1 RNA والصفات التركيبية تشبه العناصر القابلة للانتقال وتشبه Retroviral proviruses الناشئة من الأحماض RNAs غير الممرضة من الأنواع غير المتقاربة من مميزة النواة.

تتابع اكتشاف الفيرويدات:

إن أول كائن ممرض امكن تمييزه وتعريفه على أنه فيرويد هو العامل المسبب لمرض الدرنة المغزلية فى البطاطس Potato spindle tuber viroid (كان يكتب

باختصار PSTV ولكن بعد سنة ١٩٩٢ إتفق العلماء على إضافة حرف (d) لتمييزها عن اسم الفيروسات واصبح يكتب PSTVd. لذا يلاحظ أن الفيرويدات كانت تكتب بدون حرف d ثم بعد الاتفاق أصبحت جميع الأسماء يضاف إليها هذا الحرف)، والذى كان ينظر إليه لمدة طويلة بأنه فيرس. كان أول إثبات على خطأ هذا الاعتقاد بواسطة العلماء Diener & Raymer سنة ١٩٦٧ حيث ذكرا بأن الكائن الممرض عبارة عن حمض RNA حر ولا يوجد أى جزيئات يطلق عليها علمياً إسم فيرس فى النبات المصاب. عندما تأكد الوزن الجزيئى لهذا الكائن الممرض سنة ١٩٧١ بواسطة كل من Diener و Singh فقد استعمل اصطلاح فيرويد = Viroid= لكى يمكن التفريق بين هذه الأحماض النووية RNAs المعدية والخالية من البروتين، وبين الفيروسات الكلاسيكية المألوفة التى تكون مغلفة بكبسولة من البروتين.

أما الكائن الثانى الذى أمكن تمييزه كفيرويد يصيب النباتات هو مسبب مرض اكسوكورتز الحمضيات Citrus Exocortis Viroid وأطلق عليه CEVd وذلك بواسطة Semacik & Sanger سنة ١٩٧٢. ثم بعد ذلك اكتشف فيرويد تقزم الاقحوان Chrysanthemum stunt viroid (CSVd) وذلك بواسطة Hollings و Diener سنة ١٩٧٣. ثم بعد ذلك توالت اكتشافات الأمراض الفيرويدية ومسبباتها كما فى جدول رقم ١، وإن معظم هذه الأمراض ذات أهمية إقتصادية فى المحاصيل النباتية. فمثلاً فيرويد كاذانج ـ كادانج Cadang - Cadang الذى يصيب نخيل جوز الهند يسبب خسائر شديدة فى مزارع واسعة وهدد بشدة إقتصاد جميع المناطق التى يزرع فيها فى الفلبين.

جدول ١ : الأمراض الفيرويدية المكتشفة حتى سنة ١٩٨٣

اسم المرض الفيرويدى	المدى العائلى	الاختصار	سنة الاكتشاف	العالم المكتشف
١ـ Potato spindle tuber Viroid	معظم نباتات العائلة الباذنجانيه	PSTVd	١٩٧١	Diener
الدرنة المغزلية فى البطاطس				Singh & Clark
٢ـ Citrus exocortis Viroid	الحمضيات، العائلة المركبة	CEVd	١٩٧٢	Sanger
اكسوكورتز الحمضيات	العائله الباذنجانية			Semancik & Weathers
٣ـ Chrysanthemum Stunt Viroid	أنواع من العائلة المركبة	CSVd	١٩٧٣	Hollings & Stone
تقزم الاقحوان				Diener & Lowson
٤ـ Chrysanthemum chlorotic mottle Viroid	أنواع من العائلة المركبة	CCMVd	١٩٧٥	Remaine & Horst
الشحوب المتبرقش فى الاقحوان				
٥ـ Cucumber pale Fruit	العائلة القرعيه والطماطم	CPFVd	١٩٧٤	Van Dorst & Peters
الثمرة الباهتة فى الخيار			١٩٧٦	Sanger et al
٦ـ Coconut cadang - cadang	نخيل جوز الهند	CCCVd	١٩٧٥	Randles
كادانخ ـ كادانخ فى جوز الهند			١٩٧٦	Randles et al
٧ـ Hop Stunt	العائلة الباذنجانية العائلة القرعية	HSVd	١٩٧٧	Sasaki & Shikata
تقزم حيشية الدينار				
٨ـ Columnea erythrophae	ــــــ	ــــ	١٩٧٨	Owens et al
كولمينا الكامن				
٩ـ Avocado sun blotch	الافوكادو	ASBVd	١٩٧٩	Thomas & Mohamed
ضربة الشمس فى الافوكادو	القرفة		١٩٨٠	Mohamed & Thomas
١٠ـ Tomato apical Stunt	معظم نباتات العائلة الباذنجانية	TASVd	١٩٨١	Walter
تقزم قمة الطماطم				
١١ـ Tomato planta macho	الطماطم وبعض نباتات العائلة الباذنجانية	TPMVd	١٩٨٢	Galindo et al
النبات الذكر فى الطماطم				
١٢ـ Burdock Stunt	الباردوك	BSVd	١٩٨٣	Chen et al

ملاحظة هامة :

١ ـ كان يكتب اسم الفيرويد بأخذ الحرف الأول من كل كلمة لغاية سنة ١٩٩٢ ثم بعد ذلك إتفق العلماء على إضافة حرف (d) بعد حرل الـ (V) لتميزه عن الفيرس ولزيادة عدد الفيرويدات المكتشفه.

٢ ـ كان المرض رقم (١٠) يسمى سابقاً Tomato bunchy top disease.

مراجع خاصة بالفصل الأول

1 - Diener, T. O., Raymer, W. B. 1967. Science 158 : 378 - 381.

2 - ——————1971. Comparative Virology ed. K. Maramorosch E. Kurstak, 433 - 467 New York Academic Press. 584.

3 - —————1972. Advance Virus Res. 17 : 295 - 313.

4 - —————1963. Virology 8 : 7 - 30.

5 - ————— et al. 1974. Virology 57 : 577 - 581.

6 - ————— 1979. science 205 : 859 - 866.

7 - Semancik, J. S., Weathers, L. G. 1968. Virology 36 : 326 - 328.

8 - ——————————— . 1970. Phytopathol. 60 : 732 - 736.

9 - ——————————— . 1972. Nature New Biol., 237 : 242 - 244.

10 - ——————————— . 1973. Virology 53 : 448 - 456.

11 - Singh, R. P., Bagnall, R. H. 1968. Phytopathol. 58 : 696 - 699.

12 ————— and Clark, M. C. 1971. Biochem. Biophys. Res. Commun 44 : 1077 - 83.

13 - Lawson, R. H. 1968. Phytopathol. 58 : 885 Abs.

14 - Loening, U. E. 1967. Biochemist J. 102 : 251 - 257.

15 - Kleinschmidt, A. K., Zahn, R. K. 1959. Z. Naturforsch B 14 : 770 - 779.

16 - Engelhardt, D. L. 1972. J. Virol. 9 : 903 - 908.

17 - Sogo, J. M., Koller, T., Diener, T. O. 1973. Virology: 55 : 168 - 170.

18 - Boedtker, H. 1971. Biochem. Biophys. Acta. 240 : 299 - 308.

19 - Sanger, H. L. 1972. Advan. Biosci, 8 : 103 - 116.

20 - ———— . 1984. Microb, 281 - 334.

21 - Zaitlin, M., Hariharasubramanian, V. 1972. Virology 47 : 296 - 305.

الفصل الثانى

الفيرويدات وتفاعلاتها مع العائل

Viroids And Their Interaction With The Host

مقدمة Introduction :

الفيرويدات هى عبارة عن أحماض نووية ذات وزن جزيئى منخفض (١,١ × ١٠ ٥) دالتون وذات تركيب فريد، يمكن عزلها من أنواع معينة من النباتات الراقية التى تعانى من أمراض معينة مميزة. الفيرويدات لم تكتشف ولم تعرّف فى الأفراد السليمة من نفس تلك الأنواع التى تظهر عليها الأعراض، ولكن عند ادخالها فى مثل تلك الأفراد فإنها تتضاعف (تنسخ) تلقائياً بذاتها بالرغم من صغر حجمها وتسبب مجموعة الأعراض المرضية التى تظهر على النبات. وبالتالى فإن الفيرويدات هى عوامل مسببة للأمراض.

إن الفيرويدات غير مشابهة للأحماض النووية الفيروسية حيث أنها أحماض نووية غير مغلفة، وكذلك فهى غير مشابهة للفيرونات Virons حيث أنه لم يعزل أى فايرون من النسيج المصاب (الفايرون هو جزئ واحد من الفيرس)، وتختلف فى جميع صفاتها عن الفايرونات. جميع أفراد الفيرويدات التى عرفت حتى الآن تتكون من حمض نووى RNA وجميعها قد عزلت من نباتات راقية. تشكل الفيرويدات صف Class جديد من الكائنات الممرضة تحت الفيروسية وهى أصغر العوامل المعروفة المسببة لأمراض معدية.

حصل تقدم كبير فى مفهوم الفيرويدات منذ تسميتها سنة ١٩٧١ بواسطة العالم Diener وذلك عندما وضع أسس جديدة لهذا العلم مبنية على صفات العامل المعدى المسئول عن مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس. لقد وجد أن هذه الصفات تختلف أساسياً عن تلك الصفات التقليدية والمعروفة للفيروسات على الأقل فى خمسة إعتبارات هامة.

١ ـ يوجد الفيرويد فى الطبيعة على شكل حمض نووى RNA غير مغلف بكبسولة أو غطاء بروتينى .

٢ ـ لم يكتشف فايرون أو أجسام شبيهة بالفايرون فى النسيج المصاب بالفيرويدات.

٣ ـ الحمض النووى RNA فى الفيرويدات ذو وزن جزيئى منخفض.

٤ ـ بالرغم من صغر حجم الحمض النووى RNA المعدى إلا أنه ينسخ ويتضاعف تلقائياً بذاته فى الخلايا القابلة للاصابة، هذا يعنى أنه لا يتطلب فيرس مساعد (كان فى بداية الأبحاث يعتقد بضرورة وجود فيرس مساعد مع الفيرويد لكى يتكاثر) .

٥ ـ يتكون الفيرويد من حمض نووى ذو تركيب أولى وثانوى وثالث وفى النهاية يأخذ شكل دائرة.

مما سبق يمكن القول بأن الفيرويد عبارة عن كائن حيوى متميز عن مسببات الأمراض الأخرى.

إذا ما نظر الباحث إلى الكتب الحديثة التى تبحث فى الكيمياء الحيوية، البيولوجيا الجزيئية أو الكائنات الحية الدقيقة، فإنه يمكن أن يلاحظ فى هذه الكتب ما ملخصه أن الفيرويدات هى أصغر مسببات الأمراض تتكون من RNA وهى أصغر التركيبات ذات التضاعف (التناسخ) الذاتى وهى أقل المستويات فى التسلسل الهرمى فى الحياة.

تعتبر الفيرويدات من المسائل المثيرة والمريبة، ليس فقط من ناحية البيولوجيا الجزيئية ولكن أيضاً من ناحية علم الفيرس، علم أمراض النبات، الفيزياء الحيوية وفى علوم أخرى ذات صلة بها. إن الزيادة الواضحة فى معرفتنا عن الفيرويدات يمكن أن تلاحظ بزيادة الأبحاث التى تجرى عليها باستمرار.

يمكن القول بأن الفيرويد عبارة عن حمض نووى RNA احادى الخيط تتخلله أجزاء دائرية، يتكون من بضع مئات من النيوكليتيدات ويكون ممرض فى النباتات الراقية فقط. لوحظت الأهمية الاقتصادية للأمراض الفيرويدية فى النباتات منذ الربع الأول من القرن العشرين، ولكن فى تلك الفترة كانت تعتبر هذه الأمراض متسببة عن فيروسات.

فى بعض الاعتبارات هناك ظاهرة تشبه الفيرويدات وهى الفيروسايدات Virusoids ، وهذه الأخيرة عبارة عن جزيئات من الحمض RNA بحجم وتركيب يشبه الفيرويد وتكون مغلفة مع بعضها البعض بحجم كبير من RNA كما فى كثير من الفيروسات النباتية وهى لا تتناسخ ذاتياً ولكن بعضها يسلك مثل RNAs المرافقة للفيروسات العادية والبعض الآخر يمكن أن يكون جزء مكمل فى آلية التناسخ فى الفيرس.

تفاعلات خلية عائل الفيرويد Viriod - Host Cell Interactions

عندما تدخل الفيرويدات فى الخلايا القابلة للإصابة فإنها تتضاعف ذاتياً، هذا يعنى بدون الحاجة إلى فيرس مساعد. هذه القاعدة البيولوجية الحقيقية أثارت عدداً من الأسئلة مثيرة للاهتمام أهم هذه التساؤلات هى: -

١ - باى ميكانيكية تتضاعف الفيرويدات ؟؟. ونظراً لأن الفيرويدات قد تحددت على أنها أنواع مميزة ذات وزن جزيئى منخفض من الحمض النووى RNA هذا الذى يدخل كمية قليلة جداً من المعلومات الوراثية فى خلايا العائل. لذا يبدو أولاً أن أنزيمات العائل الموجودة قبل دخول الفيرويدات، معمظها أو كلها تكون مسئولة عن تضاعف الفيرويد.

٢ ـ باى ميكانيكية تحدث الفيرويدات المرض فى عوائل معينة؟؟ علاوة على ذلك فإنها تتكاثر فى أنواع نباتية أخرى قابلة للإصابة بدون إحداث أضرار مميزة فى العائل!!.

فى الصفحات اللاحقة إن شاء الله سوف نجد أجوبة لهذه التساؤلات.

موقع الفيرويدات فى الخلية Subcellular Location :

لقد أظهرت الإختبارات الحيوية للأجزاء تحت الخلوية من أوراق طماطم مصابة بفيرويد PSTVd أن أجزاء النواة فقط تحتوى على فيرويد يمكن تقديره. أما الكلوروبلاست، الميتوكندريا، الرايبوسومات والأجزاء الذائبة تحتوى على آثار فقط من الفيرويد. إن معظم كمية الفيرويد فى النبات تكون مرافقة للكروماتين ويمكن استخلاصها على شكل حمض نووى RNA حر بدون منظم فسفاتى. إن فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd يكون أيضاً بشكل أساسى فى مكونات النواة ملاصقاً تماماً للكروماتين أما بالنسبة لهذا الفيرويد عندما يصيب نبات Gynura aurantiaca فإن كمية لا بأس بها من الفيرويد تكون مرافقة لمكونات شبه غشائية للبلازما فى الجهاز الغشائى الداخلى، هذا ما ذكره العالم Semancik سنة ١٩٧٦.

إن الحقيقة التى تقول بأن PSTVd المعدى يكون موجوداً أولاً فى أنوية الخلايا لم تقدم الدليل على أنه يبنى هناك، وعلى أية حال فإن التجارب المعملية على نظام بناء RNA والتى فيها يستعمل أنوية خلايا نقية من أوراق طماطم مصابة كمصدر أنزيمى، أعطت هذه النتائج المذكورة، وبالتالى يبدو أن الفيرويد المعدى الداخل فى النبات يتحرك إلى النواة (بميكانيكية معينة) ويتكاثر هناك. إن غياب كميات معنوية من PSTVd من أجزاء أو مكونات السيتوبلازم فى الخلايا المصابة يؤدى إلى القول بأن معظم الذرية الناتجة من تكاثر الفيرويد تبقى فى النواة.

وبشكل عام فإن الفيرويدات توجد فى الطبيعة على شكل معقدات مع المكونات النووية وموجودة فى أجزاء خاصة أو عضيات الخلية. إن الدراسات

الحديثة التى بنيت على إختبارات الحيوية قد أثبتت أن الفيرويدات مرافقة بشكل أساسى مع الأنوية و / أو الأغشية النووية. وفى أبحاث أخرى فإن الأنوية عالية النقاوة والكلوروبلاست من نسيج ورقة طاطم قد استعمل فى الدراسة ومحتواها من PSTVd قد حدد كمياً بواسطة الاتجاه المزدوج من الهجرة الكهربائية فى الجيل، فقد وجد أن ٩٥٪ من RNA الفيرويدى فى الأنوية، لا يوجد تجانس فى التوزيع داخل النواة ولكنه مترافقاً مع أجزاء النوية. عند زيادة القوة الأيونية، هذا يؤدى إلى إنطلاق الفيرويدات. لقد استنتج من كل ما سبق أن الفيرويدات مترافقة مع النوية بواسطة بروتين حمض نووى. اعتماداً عى ما تقدم وجد أن متوسط عدد نسخ الفيرويد بين ٦٠٠ ـ ١٠٠٠٠ نسخة فى الخلية.

ترجمة الفيرويد Viriod Translation :

إن الفيرويدات ذات سلسلة طولها كاف لأن يشفر لعديد من الببتيدات حوالى ١٠٠٠٠ دالتون، مع أنه فى حالة PSTVd الدائرى فإن العدد الفردى للنيوكليتيدات والذى من ناحية نظرية يسمح بثلاثة دورات فى الترجمة بطريقة تتغير كل مرة.

الإختبارات التى أجريت فى المعمل على RNA لفيرويد PSTVd و CEVd لكى يقوم بوظيفة tRNA فى أنظمة مختلفة لبناء البروتين فى الخلية المفردة الحرة، أعطى دليلاً على أنه لا يوجد أى من هذين الفيرويدين عنده كفاءة لمثل هذه الوظيفة. وجد أن CEVd أيضاً لا يترجم فى بويضات **Xenopus laevis** حتى بعد أن أجرى له عملية polyadenylation فى المعمل ولم يمكنه أن يتدخل فى ترجمة mRNAs الداخلى. إن إفتقار PSTVd إلى حيوية ونشاط mRNA ليست غريبة بالنظر إلى حقيقة أنه لا يوجد كودون الابتداء AUG فى ترتيب نيوكليتيداته (هناك عديداً من المجموعات الثلاثية GUG من الممكن أن تعمل كبادئ).

مع أن الفيرويدات لا تعمل مثل mRNA's فى هذه الأنظمة، إلا أنها يمكن أن تترجم فى الطبيعة عن سلسلة مكملة من RNA مبنية بواسطة أنزيمات العائل الموجودة مسبقاً مع استعمال RNA الفيرويدى المعدى كقالب. لقد حددت

وعرفت تتابعات النيوكليتيدات فى RNA المكمل للفيرويد فى النسيج المصلب وذلك بواسطة العالم Owens سنة ١٩٨٠. ولقد إقترح أن هذه السلسلة المكملة للفيرويد يمكن أن تعمل عمل RNA's. أما بالنسبة لفيرويد PSTVd فإن السلسلة المكملة له (cPSTVd) كما أنشأت حسب تتابع نيوكليتيدات الفيرويد يمكن نظرياً أن تعمل عمل mRNA. مع أن cPSTVd لا يحتوى على أى من الوحدات الثلاثة الابتدائية (لبدء البناء) AUG إلا أنه يحتوى أربعة وحدات ثلاثية GUG وستة وحدات ثلاثية لتوقف البناء والتى نظرياً تؤدى إلى أربعة عديدات الببتين تحتوى ١٠٨، ٧٩، ٤٣ أو ٢٨ حمض أمينى. وسواء كان أم لم يكن RNA's المكمل للفيرويد يعمل عمل mRNA's (لا يعرف حتى الآن) إلا أنها إذا كانت تعمل فإن بروتينات خاصة فيرويدية غريبة يمكن أن تكتشف فى تحضيرات البروتين من نسيج العائل المصاب.

إن المقارنة بين أنواع البروتين فى الطماطم السليمة والمصابة بفيرويد PSTVd وفى نباتات **Gynura aurantiaca** سليمة ومصابة بفيرويد CEVd، على أية حال، لم تظهر إختلافات نوعية بين النباتات السليمة والمصابة. فى تلك الدراستين ظهر أن هناك زيادة فى بناء إثنين من البروتينات على الأقل فى النباتات المصابة عنه فى نسيج النباتات السليمة، ولكن تبين بعد ذلك أن هذين البروتينين خاصين بالعائل وليس بالفيرويد. كذلك فإن التحليل بالهجرة الكهربائية فى الجيل ذات الاتجاهين للبروتينات المصنعة فى كل من خلايا الطماطم المصابة أو غير المصابة بفيرويد PSTVd والمأخوذ من المزارع المعلقة أظهرت أنه لا يوجد تغيرات كمية ولا كيفية تنتج عن بقاء الفيرويد داخل الخلية.

علاوة على ذلك برغم أن طرقاً أكثر حساسية فى التحليل يمكن أن تكشف عن وجود عديد من بروتينات خاصة بالفيرويد فى الخلايا المصابة، إلا أنه فى ضوء المعلومات الحالية يجب أن نخرج بنتيجة أن الفيرويدات لا تعمل عمل mRNA's. وإذا كان كذلك فإن ترتيب نيوكليتيدات cRNA الموجود فى النسيج المصاب يجب أن يكون قد صنع كلية بواسطة أنزيمات العائل الموجودة سابقاً إلا أنها من الممكن أن تكون قد استحثت.

تـركيب الجزئ Molecular Structure

مقدمة :-

الفيرويدات هى جزيئات من RNA احادى السلسلة مكون من شكلين دائرى مغلق ومستقيم ويتخلل هذين الشكلين من RNA مناطق قصيرة تأخذ شكل قريب من الحلزون المزدوج والتى تتكون نتيجة لتكوين ما يسمى بتركيب دبوس الشعر hairpin بين تتابعات متكاملة كثيرة موجودة فى الجزئ بحيث تتزواج عند إلتواءها وتكون مناطق مزدوجة السلسلة والتى تظهر تحت الميكروسكوب الالكترونى كأنها عصيات مزدوجة السلسلة.

لقد تحدد ترتيب النيوكليتيدات كاملاً فى فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وذلك بواسطة العالم Gross سنة ١٩٧٨. واعتماداً على أساسيات هذا الترتيب بالإضافة إلى دراسات الدنميكا الحرارية Thermodynamic والنشاط الانتقالى لدرجات الحرارة المدنترة لهذا الفرويد، إقترح نموذجاً للتركيب الثانوى لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس. واعتماداً على هذا النموذج فإن الفيرويدات توجد فى شكلها الطبيعى على هيئة تركيب يشبه العصوى ممتد يتميز بسلسلة من قطع ذات شكل حلزونى مع وجود عروات داخلية. وبالتالى فإن التركيب شبه العصوى الذى كان يفترض للفيرويدات الطبيعية يعتبر الآن غير صحيح ومبنياً على النقص ويفضل عليه التركيب شبه العصوى ذو العروات الداخلية وأطراف شبه دائرية مع تركيب دبوس الشعر.

بعد ذلك فإن الترتيب الكامل لنيوكليتيدات فيرويد تقزم الاقحوان CSVd قد تحدد بواسطة العالم Haseloff سنة ١٩٨١. وبالمقارنة الواضحة مع فيرويد الدرنة المغزلية PSTVd والذى يتكون من ٣٥٩ نيوكليتيدة فإن فيرويد CSVd يتكون من حمض نووى RNA وحيد السلسلة دائرى مغلق يتكون من ٣٥٦ نيوكليتيدة، من

بين هذه النيوكليتيدات المتتابعة هناك ٦٩٪ منها موجود فى فيرويد PSTVd وبالتالى فإن كلا الفيرويدين يمكن أن يشكلا تركيب ثانوى متماثل.

كذلك فإن السلالات المعتدلة من PSTVd قد أجرى لها عملية ترتيب، وإن نتائج التركيب الأولى قورنت مع تلك التى حددت سابقاً للسلالات الشديدة. تبين أن السلالات المعتدلة تختلف عن السلالات الشديدة بثلاثة نيوكليتيدات تتواجد فى مواقع مختلفة من الجزئ وهى AA إلى U فى الموقع ١٢٠ ـ ١٢١، A إلى U فى الموقع ٣١٠ ودخول U بين موقعى ٣١٢، ٣١٣ كما حدده Gross سنة ١٩٨١.

إن هذه النتائج متسقة مع النتائج السابقة والتى ذكرت أن الفيرويدات تتكون من أنظمة وراثية صفاتها مشفرة فى ترتيب النيوكليتيدات فىRNAs. وبالتالى فإن ترتيب النيوكليتيدات فى النوع المفرد من الفيرويدات يختلف بشكل واضح عن بعضها البعض، بينما ترتيب سلالات النوع الواحد يختلف إختلافاً بسيطاً فقـط. ومن المهم أن نذكـر أن الاختلافـات البسيطة فى ترتيـب السلالاتين المعتدلة والشديدة فى فيرويد PSTVd لم يكن يتوقع أن يكون لها مثل هـذه النتيجة البيولوجية العميقة.

١ ـ التركيب الأولى والثانوى Primary and Secondary Sturcture

إن وصف الفيرويدات بأنها حمض نووى RNA خال من البروتين وثبوت صغر حجمها والتعرف على شكلها الدائرى، كل ذلك كان سبباً أساسياً لدراسة تتابع النيوكليتيدات فيها وتركيبها الثانوى المعقد. وعلى كل حال فإن الإسهاب فى شرح التركيب، الشكل شبه العصوى والخيط المفرد، موديل التركيب الثانوى الذى يتكون من عروات وحلزون Loops and helixes أصبحت معروفة جيداً قبل أن يتحدد تتابع النيوكليتيدات.

هناك طريقة واحدة يبدو أنها تبشر بنجاح الحصول على تفصيل متقن للترتيب الكامل للنيوكليتيدات فى الفيرويد:

فى المعمل فإن تعليم `5 لأجزاء الفيرويد التى حصل عليها بواسطة الهضم الكلى أو الجزئى باستعمال أنزيم رايبونيوكلييز النوعى مع-5`- polynucleotide Ki nase و ATP $(\gamma - p)^{32}$. إن أول تركيب كامل للفيرويد كان قد تحدد بواسطة هذه الطريقة، كان للفيرويد PSTVd. هذا يؤكد دون التباس وجود الشكل الدائرى فى الجزئ ويظهر عديداً من صفات التركيب والتى أصبحت نموذجية لجميع الفيرويدات. أما النيوكليتيدات المتحورة نوعا ما كما فى تلك الموجودة فى tRNA لم يمكن تعريفها.

إن التركيب الثانوى للفيرويدات كان قد أستنتج من نتائج التجارب ومن مدلولات النظريات. إن التركيب الثانوى للفيرويدات يكون فى شكل سلسلة غير متفرعة من لولب قصير مضاعف ذو عروات داخلية صغيرة. كل هذا كان واضحاً تماماً فى فيرويد PSTVd وتأكد بواسطة كل التتابعات التى حددت فيما بعد.

وأخيراً فإن نظام التتابع الثانوى قد استعمل بنجاح فى كل من:-

١ - نسخ الفيرويد المستقيم إلى cDNA.

٢ - الكلونة Cloning.

٣ - تتابع cDNA للفيرويد المكلون وذلك بالاعتماد على تكنيك تتابع ال DNA.

مع أن مراقبة التتابع بواسطة التعليم بالاشعاع فى المعمل قد أظهر بأن تجمعات الفيرويد تحتوى على تتابع مختلف وأن ترتيب العديد من cDNA المكلـون للفيرويد

شكل رقم ٢ :

التتابع والتركيب الثانوى للفيرويدات. CCCVd 1 - small تحوى ٢٤٧ نيوكليتيدة. التتابع فى المنطقة المحفوظة كعلب تسمى المنطقة عالية الحفظ.

الواحد يسمح بتوطيد وتثبيت التتابع الفردى للمتنوعات حتى فى تلك الحالات حيث أن عدم التجانس لا يعرف بواسطة التتابع المباشر للحمض RNA.

فى شكل (٢) تتابع بعض الفيرويدات مرسوم فى تركيبها الثانوى والذى هو مأخوذ من ورقة البحث الأساسية وإن المقارنة بين تتابع هذه الفيرويدات يدل على أن هناك على الأقل ثلاثة مجموعات من الفيرويدات:-

١ - مجموعة PSTVd والتى تضم PSTVd، TPMVd، TASVd، CEVd، CSVd وإلى حد ما تضم HSVd و CPFVd.

٢ - مجموعة ASBVd.

٣ - مجموعة CCCVd. إلا أن هذا سيوضح بالتفصيل فى دراسة التصنيف فيما بعد.

فى جدول رقم ٢ هناك بعض المعلومات الكمية عن التتابع والتركيب الثانوى للفيرويد. إن أفراد مجموعة PSTVd تتميز بالتتابع المتماثل (المتناظر) لحوالى ٦٠ - ٧٠٪ أو أكثر من حيث نيوكليتيداتها A:U, G:C، وبالتالى فإن نسبة البيورين إلى البيرميدين تكون واحدة تقريباً وهناك حوالى الضعف من ازواج القواعد G:C بالنسبة إلى A:U. إن بين ٤ - ١٦٪ من ازواج القواعد تكون ازواج G:U. بالقرب من منتصف التركيب الثانوى هناك يوجد منطقة تتابعها متناظر جداً تظهر كمنطقة معلبة فى شكل٢. هناك خيط ممتد طويل من ال polypurine موجود بالقرب من هذه المنطقة المركزية المحفوظة وإن تماثل التتابل يكون عالياً فى النصف جهة اليسار من التركيب الثانوى عنه فى النصف اليمين. إن النصف اليسارى يكون أقل ثباتاً من ناحية ديناميكية عنه فى النصف اليمينى. وبشكل واضح فإن التركيب الثانوى لهذه الفيرويدات يمكن تقسيمه إلى جزء يسارى والذى يحتاج تتابعات محفوظة مع بعضها البعض إلى حد ما بتركيب لولبى بسبب إنخفاض الثبات الديناميكى، والنصف اليمينى، والذى يكون فيه الثبات أكثر أهمية من تتابع النيوكليتيدات.

بالنسبة لإثنين من الفيرويدات فى مجموعة PSTVd، فإن الفيرويد PSTVd نفسه والفيرويد CEVd هما عزلات مختلفة (طفرات) معروفة بأنها تختلف بواسطة تتابعها وجزئياً بشدة الإصابة مثل التعبير بالأعراض. أما ASBVd، CCCVd فهى تختلف عن بعضها البعض بمقدار ما تختلف عن فيرويدات مجموعة PSTVd. فمثلاً ASBVd ، CCCVd لا تحتوى على تتابع polypurin. فى CCCVd يوجد منطقة محفوظة مركزية، بينما فى ASBVd يوجد فقط تعاقب مشترك من GAAAC. كذلك فإن هذه ال GAAAC موجودة فى الفيروسايدات فى المنطقة المركزية فى التركيب الثانوى. كذلك فإن ASBVd يظهر أقل تناظراً مع الفيرويدات الأخرى.

بالإضافة إلى أن CCCVd يختلف عن جميع الفيرويدات بسبب أن هناك أربعة تنوعات من CCCVd ذات أطوال مختلفة تكون مترافقة مع مرض كادانج ـ كادانج فى جوز الهند فهى تسمى:

١ ـ CCCVd 1 - Small به ٢٤٦ نيوكليتيدة وهو عبارة عن تضاعف تماماً فى CCCVd 2 - Small حيث يحوى الأخير ٤٩٢ نيوكليتيدة. وهى تحدث فى الأطوار المبكرة من المرض بينما يظهر إثنان من الأحماض النووية RNA متأخراً بعد عدة سنوات من الإصابة.

٢ ـ CCCVd 1 - Large فيه ٢٨٧ نيوكليتيدة.

٣ ـ CCCVd 2 - Large فيه ٥٧٤ نيوكليتيدة.

يختلف CCCVd نوع 1 - Large عن نوع 1 - Small عن نوع فى تضاعف ٤١ نيوكليتيدة فى النهاية اليمنى فى التركيب الثانوى وهذا سبب ظهور العزلةBaao 54. إن حجم المنطقة المضاعفة يختلف بين ٤١ ـ ٥٥ بين العزلات المختلفة من CCCV.

جدول ٢ : التركيب الأولى والثانوى للفيرويدات.

الفيرويد	النيوكليوتيدات					التتابع المتماثل %		اعداد النيوكليوتيدات المتغيرة بين العزلات			ازواج القواعد				
	المجموع	A	U	G	C	مع PSTVd	بين العزلات	مستبدلة	مقحمة	مزالة	درجة %	العدد الكلى	G:U %	G:C %	A:U %
PSTVd	٣٥٩	٧٣	٧٧	١٠١	١٠٨	١٠٠	١٠٠	–.	–	–	٧٠	١٢٦	١٣	٥٨	٢٩
PSTVd عزلةمعتدلة	٣٥٩	٧٠	٨٠	١٠١	١٠٨	–	٩٩	٢	١	١	٧١	١٢٨	١٣	٥٧	٣٠
PSTVd عزلة شديده	٣٥٩	٧٤	٧٧	١٠٠	١٠٨	–	–	٤	٠	٠	٦٩	١٢٤	١٢	٥٨	٣٠
TPMVd	٣٦٠	٧٢	٨١	٩٩	١٠٨	٨٣	٩٩	–	–	–	٦٨	١٢٢	٩	٦٠	٣١
TASVd	٣٦٠	٧٠	٩٠	١٠١	٩٩	٧٣	–	–	–	–	٧٣	١٣١	١١	٥٧	٣٢
A-CEVd	٣٧١	٧٢	٧٥	١١٢	١١٢	٧٣	١٠٠	–	–	–	٦٩	١٢٨	١٦	٥٦	٢٨
C-CEVd	٣٧١	٧٣	٧٦	١١٠	١١٢	–	٩٩	٤	٠	٠	٦٩	١٢٨	١٦	٥٦	٢٨
AM-CEVd	٣٧١	٧٢	٧٦	١١٠	١١٣	–	٩٩	٤	٠	٠	٦٧	١٢٥	١٦	٥٦	٢٨
DE 25-CEVd	٣٧١	٧١	٧٦	١١٢	١١٢	–	٩٩	٤.	٠	٠	٦٩	١٢٨	١٦	٥٦	٢٨
DE 26-CEVd	٣٧١	٦٩	٨٠	١١٢	١١٠	–	٩٣	١٥	٦	٦	٦٨	١٢٦	١٤	٥٨	٢٨
E-CSVd	٣٥٤	٧٤	٩٣	٩٠	٩٧	٧٣	١٠٠	–	–	–	٦٩	١٢٢	١٠	٥٦	٣٤
A-CSvd	٣٥٦	٧٥	٩٣	٨٩	٩٩	٦٩	٩٧	٦	٤	٢	٧٠	١٢٤	١٣	٥٢	٣٥
HSVd	٢٩٧	٦١	٦٩	٧٩	٨٨	٥٥	١٠٠	–	–	–	٦٧	١٠٠	٧	٦٤	٢٩
CPFVd	٣٠٣	٦٤	٧٠	٨١	٨٨	٥٥	٩٧	٨	٧	١	٦٩	١٠٥	٤	٦٥	٣١
ASBVd	٢٤٧	٦٨	٨٥	٥١	٤٣	١٨	–	–	–	–	٦٧	٨٣	١٤	٣٤	٥١
صغير CCCVd -1	٢٤٦ ٢٤٧	٥٣	٤٧	٧٣	٧٣ ٧٤	١١	١٠٠	–	–	–	٦٥	٨٠	٨	٦٩	٢٤
كبير Baao 54	٢٨٧	٥٩	٥٨	٨٦	٨٤	–	١٠٠	٠	٤١	٠	٦٤	٩٢	٨	٦٧	٢٥
Ligao 14 B	٢٩٦	٥٩	٥٩	٩١	٨٧	–	١٠٠	٠	٥٠	٠	٦٥	٩٦	٨	٦٨	٢٤
Ligao T1	٣٠١	٦٠	٥٩	٩٣	٨٩	–	١٠٠	٠	٥٥	٠	٦٤	٩٧	٨	٦٨	٢٤
San Nascisco	٢٩٧	٥٩	٥٩	٩١	٨٨	–	١٠٠	٠	٥١	٠	٦٥	٩٦	٨	٦٨	٢٤

ملاحظات:

١ ـ يعتبر CPFVd بالنظر إلى تتابعه المتناظر تنوع من HSVd.

٢ ـ CCCvd - 1 الصغير هو خليـط من الأنواع واحد يحتـوى 197 فى موقع C والآخر يحتوى CC فى ذلك الموقـع. وهـناك CCCvd - 2 لم يذكـر فى الجدول لأنه تضاعف لـ RNAs المتناظرة.

٣ ـ جميع عزلات CCCVd1 الكبير تختلف عن عزلة الصغير وذلك بتضاعف التتابع على النهاية اليمنى فى التركيـب الثانوى وبالتالـى يكون تناظر التتابع ١٠٠ ٪. إن المنطقـة المتضاعفة قد ذكرت تحت بند المقحمة. أما عــزلة Baao 54، Ligoa 14B، Ligao T1 قد إشتقـت من CCCVd1 الصغير مع ٢٤٦ نيوكليتيدة. أما Aan Nascisco هو مشتـق من CCCVd1 الصغـير ٢٤٧ نيوكليتيدة.

٢ ـ التركيب الثانوى Secondary Structure :

كما ذكر سابقاً فإن التركيب الثانوى للفيرويدات قد استنتج من نتائج التجارب بالإضافة إلى الحسابات النظرية. إن التجـارب باستعمـال المواد الكيماوية المحورة مثل : ـ

١ ـ Dye binding.

٢ ـ Oligonucleotide binding.

٣ ـ تقدير الروابط الفسفورية (الفسفات ثنائية المجموعة الاسترية) القابلة للمهاجمة بواسطة الانزيمات.

أظهرت بوضوح وجود الخيط المفرد بالإضافة إلى مناطق ثنائية الخيط. وكذلك لقد استنتج أيضاً أن معظم الجزئ يكون قابلاً للتفاعل الاشارى Ligand وغير مغلف بواسطة أى تركيب ثلاثى مؤدياً إلى شكل كروى. وعلى أية حال فإن حقيقة أن المناطق احادية الخيط والحلزونية المزدوجة تكون مرتبة فى نمط أو طريقة تسلسلية بدون تشعب أو تفرع، وهذا يمكن استنتاجه فقط من التقدير الكمى لمنحنيات الدنترة الحرارية للفيرويدات.

إن الأصل النظرى للتركيب الثانوى قام وفقاً لثلاثة مستويات:

الأول: ـ الشكل العصوى المتطاول للجزئ وهذا كان قد أخذ من نتائج التجارب وبواسطة النظام التجريبى والخطأ، فإن مخططات القاعدة المزدوجة جعلته أقرب مايكون إلى أعلى رقم من القواعد المزدوجة، ٦٩ مثلاً.

الثانى: ـ المستوى العال من التنقية. إن الأبحاث الثيرموديناميكية أثبتت وجود التركيب الثانوى للفيرويد.

الثالث: ـ إن نظام العد العشرى والحساب الذى إتبعه كثير من العلماء مثل كل من Nussinov & Jacobson سنة ١٩٧١ و Zuker & Stiegler سنة ١٩٨٠ قد طبقوه فى الحساب الدقيق للتركيب الأقل حفظاً للطاقة. وإن هذا النظام قد أحدث فيه تحسناً وتحوراً لحساب الخيوط الدائرية والقيم الأحدث لازواج القواعد الثابتة والعروات.

يمكن القول باختصار إن أبسط الطرق للحصول على أقرب مايمكن من الدقة لأعلى رقم من القواعد المزدوجة وأكثر الحسابات تعقيداً أدت إلى القول بوجود تركيب ثانوى متناظر تقريباً. الاختلافات وجدت فقط فى مناطق محدودة من الجزئ. كما أن تركيبات ثانوية متماثلة جداً حصل عليها أيضاً عندما استعملت مجموعات مختلفة من معلومات الثبات العنصرى. فمثلاً إن التركيب الثانوى للفيرويد PSTVd الذى ذكر بواسطة Riesner et al سنة ١٩٧٩ أو الذى ذكر بواسطة Jacobson سنة ١٩٨٠ كان متوافقاً تماماً. يمكن القول بكل أمان أن تركيب الفيرويد غير غامض ولا عليه التباس وبالتالى حتى التقديرات التقريبية تؤدى إلى التركيب الصحيح. جدول رقم ٣.

جدول رقم ٣ : القياسات الثيرموديناميكية للتركيب المقطعى للفيرويدات، الفيروسايدات وتتابعات عشوائية

	Δ G/N (KJ/mel)	Tm [°c]	$\Delta T_{1/2}$ [°c]	Mechanism
Viroids				
PSTVd	1.67	51	0.9	Formation of stable
CEVd	1.62	51	1.0	hairpins
CSVd	1.61	48.5	1.1	
CCCVd - 1- Large	1.53	49.1	1.2	
CCCVd - 1- small	1.53	49.1	1.4	
ASBVd	1.13	37.5	1.5	not determined
Virusoids				
SNMV2	1.43	38	2.8	___
VTMoV2	1.32	38	2.0	___
Randum sequences	1.27 ∓ 0.1	36 ± 5	> 5	___

ملاحظات:

فى التتابع العشوائى عدد النيوكليتيدات ومحتويات من A، U، C، G مأخوذة من PSTVd. التتابع العشوائى متوسط لخمسة مكررات. Tm و ΔT12 قيمها تشير إلى قوة أيونية ٠,٠١١ Na^+، رقم حموضة ٦,٨.

٣ ـ التركيب المقطعى Structural Transitions :

إن التراكيب المقطعية للفيرويدات قد درست بعدة طرق منها: ـ

أ ـ منحنيات الدنترة بالحرارة.

ب ـ طرق قياس الحرارة الدقيقة.

جـ ـ الطرق الديناميكية.

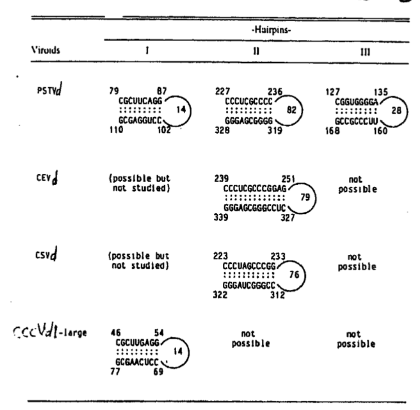
د ـ طرق الارتفاعات المفاجأة لدرجات الحرارة.

إن منحنيات التفكك سواء التى حصلت بواسطة UV - hypochromicity أو بواسطة الاختلافات الحرارية، تظهر مقطع رئيسى ضيق على حوالى ٥٠°م فى ٠,٠١١ أيون صوديوم Na^+ ودرجة حموضة pH (6.8). كذلك فإن درجة حرارة النقطة الوسطى Tm تكون أقل بحوالى ٢٠°م عن قيمة ال Tm للحمض DNA ثنائى الخيط وأقل بحوالى ٣٠°م عن الحمض RNA ثنائى الشريط عند مقارنة كليهما بمحتوياتهما من GC. إن قيمة Tm لمعظم أنواع الفيرويدات تتراوح ما بين ٥١ - ٣٦°م. أما قيمتها لمنتصف العروض لمعظم التراكيب المقطعية للفيرويدات هى $\Delta T\ 1/2$ تتراوح ما بين ٠,٩ إلى ٥°م. إن متوسط الطاقات الحرة لكل نيوكليتيدة $\Delta G / N$ يتراوح ما بين ١,٦٧ إلى ١,٢٧ كيلو جول (KJ) لكل مول. إن مقطع واحد أو إثنين من ذات ال hypochromicity المنخفض وذات/ ΔT $1/2$ قد لوحظت على درجة حرارة ١٠ ـ ٢٠°م اعلى من المقطع الرئيسى. فى المقطع الرئيسى عال التعاون فإن جميع ازواج القواعد فى التركيب الطبيعى تتفكك وتكون قطع متكاملة تكون فى أجزاء متباعدة من التركيب الطبيعى تعود تتحد ثانية لتكون شكل دبوس الشعر الأكثر ثباتاً. فى درجات الحرارة العالية فإن دبابيس الشعر هذه يحدث لها دنترة على شكل مقاطع أو أشكال حرارية منفصلة. ولقد لوحظت هذه الأشكال فى Electron micrographs. لقد وجدت دبابيس الشعر الثابتة فى التجارب على درجات الحرارة العالية. يجب أن نذكر أن دبوس الشعر رقم I موجود فى المنطقة المحفوظة جيداً.

إن شكل رقم ٣ يوضح أشكال دبابيس الشعر فى بعض الفيرويدات.

إن طريقة اعادة الترتيب لشكل الفيرويد من التركيب المتطاول الطبيعى إلى تركيب مدنتر جزئياً مع تكوين أشكال دبوس الشعر جديدة لوحظت أول مرة

بالتجارب. نفس الميكانيكية يمكن الحصول عليها نظرياً بدون إفتراض سابق عن التركيب الثانوى. إن الحسابات التى إتبعها العالم Nussinov سنة ١٩٨١ قد استعملت على درجات حرارة مختلفة وأظهرت أن الشكل المتحصل عليه يمكن أن يلتوى ويأخذ شكل ضيق يترواح ما بين الشكل المتطاول إلى الشكل المتفرع وأن الشكل الرئيسى يسهل عليه القيام بهذه الأشكال إلى حد كبير. وإن الحسابات قد أظهرت أن الدنترة تبدأ فى النصف اليسارى من التركيب الثانوى. هناك منطقتان حيث يكون التركيب الثانوى أكثر قابلية للتغير هما منطقة البولى بيورين الأكثر قابلية للمط polypurine stretch والمنطقة المجاورة إلى الجانب اليسارى من المنطقة المحفوظة. هاتان النقطتان الضعيفتان فى التركيب تقريباً متماثلتان فى الفيرويدات PSTVd ، CEVd ، CSVd .



شكل رقم ٣ :

دبابيس الشعر لأربعة فيرويدات. العدد يدل على منطقة القواعد المزدوجة والرقم فى الدائرة يدل على حجم العروة. يلاحظ دبوس الشعر رقم ٣ لا يوجد إلا فى الفيرويد PSTVd .

الوزن الجزيئى والشكل Molecular Weight and shape :

إن الأوزان الجزيئية قد حددت أصلاً من ١ ـ الهجرة الكهربائية فى الجيل. ٢ ـ Sucrose gradient ٣ ـ Electron micrographs. إن اولى الأوزان الجزيئية الدقيقة (الصحيحة) قد حصل عليها باستعمال الة الطرد عن المركز فائقة السرعة ثم بعد ذلك يتم إجراء توازن على الترسيبات بطرق معينة. ونظراً لأن تتابع تركيب الفيرويدات معروف الآن، فإن معظم الأوزان الدقيقة يمكن حسابها من هذا التتابع. يمكن الحصول على قيم جيدة بمعدل وزن جزيئى ٣٣٣ لكل نيوكليتيدة تشمل Bound cations.

أما بالنسبة للشكل، فتظهر الفيرويدات فى الصور المأخوذة بواسطة Elctron micrographs على شكل تركيب عصوى إذا ما حضرت تحت ظروف طبيعية (١,. مول كلوريد صوديوم و pH 7). هذه النتيجة معروفة بالنسبة لكثير من الفيرويدات مثل PSTVd، CPFVd، CCCVd، CSVdو HCVd. كذلك أيضاً من دراسات سرعة الترسيب على فيرويد PSTVd والاشكال الأربعة لفيرويد CCCVd، أمكن الاستنتاج بأن الفيرويدات تمتلك تركيب شبه عصوى فى المحلول، زيادة على ذلك فإنها تأخذ فى المحلول بعض المرونة التى تجعل شكلها شبه دائرى والتى يمكن تمييزها أيضاً بوجود مسافة قصيرة تتكرر فى الفيرويد، هذا الطول المتكرر يكون تقريباً نصف قطر الدائرة التى يمكن أن ينحنى إليه البوليمر، هذا الطول يساوى ٣٠٠ أنجستروم. وعند اجراء مقارنة بين هذا الطول والطول المتكرر فى حمض DNA ثنائى الشريط فيكون ٦٠٠ أنجستروم، يعنى الضعف تقريباً. إن هذا الطول ليس له علاقة بطول الفيرويد نفسه لأن طول الفيرويد لا يتجاوز ٥٠ نانوميتر.

نتيجة التحليل بطريقة Sedimentation coefficient أمكن الاستنتاج بأنه حتى فى الأشكال المضاعفة من CCCVd والتى تسمى RNA2 فإنها تتخذ فى المحلول الشكل المتطاول. العالم Haseloff et al سنة ١٩٨٢ استنتج بدراسته على أساس

التتابع فى النيوكليتيدات أن الفيرويدات تأخذ الشكل المتطاول بالإضافة إلى الشكل الصليبى.

يمكن القول بأن الفيرويد يأخذ الشكل المتطاول ذو الانتفاخات فى النهايتين ويتكون عروات بين هذين الانتفاخين، بالإضافة إلى حدوث إنثناءات التى تشكل ما يسمى دبوس الشعر.

هناك وصف آخر لشكل الفيرويد يذكره Agrios سنة ١٩٨٧ يقول فيه تظهر الفيرويدات على شكل جزيئات دائرية من RNA وحيد الخيط بأزواج عديدة من القواعد فى أجزاء هذا الخيط، تؤدى ازواج القواعد هذه إلى ظهور بعض أنواع تركيبات تشبه دبوس الشعر بخيط مفرد ومناطق مزدوجة الخيط على نفس الفيرويد.

مع أن الفيرويدات تمتلك كثيراً من صفات الأحماض النووية RNAs المفردة الخيط، إلا أنه عندما تفحص بالميكروسكوب الالكترونى تظهر بطول حوالى ٥٠ نانوميتر ولها سمك الخيط المزدوج من الحمض النووى DNA.

ولقد ذكر Maramorosch فى كتابه سنة ١٩٩١ «قال» تتخذ جزيئات الفيرويد غير المدنترة كثير من أزواج القواعد الداخلية بحيث تكون هذه الأزواج مرتبطة لتعطى تركيب شبه عصوى بطول ٥٠ نانوميتر، أما عند دنترة هذه الجزيئات فإنها تعطى دوائر احادية الشريط يكون طول ميحطها ١٠٠ نانوميتر. أما الوزن الجزيئى يساوى (٨٠ ـ ١٢٢) × ١٠^٣ أما S_2ow = ٨ ـ ١٠ أما Tm فى ١٠ ملى مول أيون صوديوم = ٥٠°م. أما الكثافة فى كبريتات السيزيوم تساوى تقريباً ١,٦ غم / سم^٣.

أما الصفات الكيماوية فذكر أن الفيرويدات تتكون من ٢٤٦ ـ ٣٧٠ نيوكليتيدة. كل الفيرويدات باستثناء ASBVd غنية بأزواج القواعد G:C بالمنطقة المحفوظة المركزية إن ال oligomers عندها الكفاءة لتشكل تركيبات بلاندورميه

(من الأمام تشبه التركيب من الخلف) تشمل الجزء العلوى من المنطقة المحفوظة المركزية. إن الفيرويدات ليس لها القدرة على أن تشفر للبروتين.

تناسخ (تضاعف) الفيرويدات

VIROIDS REPLICATION

إن تضاعف الفيرويد من ناحية نظرية يشمل النسخ إما عن قالب RNA أو DNA. إن ميكانيكية RNA الموجه تتطلب وجود تتابع مكمل للحمض RNA فى الفيرويد الكامل فى النسيج المصاب، بالإضافة إلى وجود أنزيمات مسبقة فى العائل مع أنزيم RNA - polymerase المتخصص للحمض RNA الموجه.

أما ميكانيكية توجيه DNA فإنها تتطلب أيضاً وجود تتابعات مكملة للحمض DNA للفيرويد الكامل. هذه التتابعات للحمض DNA يمكن أن تكون موجودة مسبقاً ـ بشكل مثبط ـ فى العوائل غير المصابة أو أنها يمكن أن تصنع نتيجة للإصابة بالفيرويد، وفى هذه الحالة فإن أنزيمات العائل الموجودة مسبقاً مع أنزيم DNA - polymerase المتخصص للحمض RNA الموجه أيضاً تكون ضرورية الوجود.

هل يحدث تضاعف لـ RNA أو DNA الموجه:

هناك أبحاث قديمة فى أوائل السبعينات ذكرت أن التضاعف يحدث فى كلا الحمضين RNA و DNA، إلا أنه تبين واضحاً أن تضاعف الفيرويد يحدث على قالب من RNA وليس من DNA، وإن الفيرويد الداخل هو الذى يعمل كقالب لبناء ذرية جديدة من الفيرويد وليس DNA الخاص بالعائل.

ولكى نميز بين تضاعف RNA أو DNA الموجه، فإنه تأثيرات بعض مركبات المضادات الحيوية على تضاعف الفيرويد قد درست جيداً. فى الدراسة على الطبيعة كانت تؤخذ شرائح من ورقة نبات سليم وأخرى مصابة بفيرويد PSTVd وكانت

تعامل بالماء أو بـ Actinomycin - D، وجد أن تضاعف الفيرويد كان حساساً للمثبط الذى يثبط بناء RNA من DNA الموجه وهذا وجده العالم Diener سنة ١٩٧٥ . وحصل على مثل هذه النتائج فى الدراسة المعملية على نظام بناء RNA والذى فيه كانت تؤخذ أنوية الخلايا من النباتات السليمة أو المصابة بالفيرويد PSTVd من نباتات الطماطم وتنقى جيداً وتستعمل كمصدر للانزيم.

إن حساسية تضاعف الفيرويد لمادة Actinomycin - D قد تأكدت فى دراسة قام بها العالم Muhlbach سنة ١٩٧٩ وذلك على فيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار (CPFVd) الذى ينى فى البروتوبلاست المعزول من أوراق الطماطم. فى نفس هذه الدراسة فإن تأثير amanitine - ∝ على بناء الفيرويد قد تميزت تماماً. إن وجود مادة amanitine - ∝ بتركيز ١٠-٨ مول بين الخلايا يكون كافياً لتثبيط أنزيم RNA polymerase II (الذى يختص بنسخ سلاسل جزيئات RNA المراسل mRNA) على DNA الموجه فى نباتات الطماطم، إلا أنه لا يثبط أنزيم RNA polymerase III (الذى يقوم ببناء عدد من سلاسل RNA القصيرة الناقل tRNA و rRNA) وبالتالى لا يثبط تضاعف الفيرويد CPFVd . وعلى النقيـض من الدراسات التى أجريت باستعمال Actinomycin - D والتى استعمل فيها amanitine - ∝ والذى فيها يكون تأثير هذا المركب على بناء الفيرويد ذو نتيجة غير متوقعة ليس بتثبيط نوعي لبناء RNA من DNA الموجه، ولكن تأثير سام كلى على البناء الحيوى، وأن التأثير المثبط لمادة amanitine - ∝ ليس من المحتمل أن يكون بسبب عدم التخصص النوعى ولكن بسبب التأثيرات الثانوية للمركب على ميتابولزم الخلية. إن هذا الملخص قد تأكد بالتقريرات التى بينت أن تركيز مادة- ∝ amanitine بين الخلايا الكاف لتثبيط تضاعف الفيرويد بحوالى ٧٥ ٪ لم يكن له تأثير ملحوظ على البناء الحيوى لكل من RNA لفيرس موزايك الدخان أو أنواع RNA الخلوية مثل tRNA، 5S RNA، 7S RNA و rRNA .

هناك بعض الدراسات تبين أن بناء RNA من DNA الموجه هو الداخل فى

تضاعف الفيرويد وهذا يكون أكثر وضوحاً بالتجارب التى يستعمل فيها -aman- ∝ itine ، هذه النتائج التى لم توافق تلك المتحصل عليها باستعمال Actinomycin - D فقط ولكن بالإضافة إلى استعمال أنزيم نوعى والذى يسمىRNA polymerase II الذى يعمل على DNA.

إن هذه النتائج أدت إلى القول بثقة أن أنزيم polymerase II يكون داخلاً مباشرة أو غير مباشر فى تناسخ الفيرويد. زيادة على ذلك فإن الاعتماد فى بناء CEVd على أجزاء النواة فى النباتGynura aurantiacaوعلى التركيز الأيونى مثل Mn^{2+}، Mg^{2+} ، $(NH_4)_2SO_4$ مستوى خط بناء CEVd حتى على تركيز عال من amanitine - ∝ ١٠-٨ ـ ١٠-٦ مول يمكن إعتبار تشارك RNA polymerase رقم I و III.

إن امكانية تناسخ الفيرويد بواسطة polymerase II قد دعمت بالدراسات المعملية باستعمال أنزيم RNA polymerase II نقى من نسيج طماطم سليمة أو من جنين قمح. ولقد تبين أنه بوجود أيونات Mn^{2+} فإن الأنزيم ينسخ RNA الفيرويدى إلى خيوط مستقيمة سالبة ذات طول كامل وأن هذا الفيرويد يكون مقبولاً لأن يكون قالب ذو كفاءة عالية بالمقارنة مع RNA الطبيعى أو المبنى. زيادة على ذلك أنه خلال بناء الوسيطات للطول المعين فإنه يتجمع، هذا يدل على إفتراض واضح فى ادخاله فى المعمل. ولقد ذكر أن أيونات Mn^{2+} والتى عادة تخفض تخصص القالب لانزيم البولى ميريز polymerase لا يحتاج إليها هنا (وأن الفيرويدات) حتى إذا قورنت مع الفيروسايدات تظهر درجة أعلى فى الأهمية لنشاط القالب.

فى تجارب التحليل بواسطة الة الطرز عن المركز فائقة السرعة، فإن الارتباط الثابت بين polymerase II من جنين القمح والفيرويد PSTVd وجد أنه^{7}10 M^{-1}.
إن هذا الرقم منخفضاً بالمقارنة مع إرتباط محفز ال polymerase، ولكن حوالى درجة أعلى من التكبير منه فى ارتباط ال polymerase إلى أحماض نووى RNAs طبيعية شاملة الفيروسايدات. فى التصوير الالكترونى Electron micrographs لقد

تبين أن RNA polymerase II من جنين القمح يمكن أن يرتبط من كلتا النهايتين لفيرويد PSTVd التركيب الثانوى.

إن الحقيقة التى تقول بأن الفيرويدات من الممكن أنها تستطيع أيضاً أن تنسخ فى الطبيعة بواسطة أنزيم العائل RNA polymerase II والذى عادة يقبل العمل على ال DNA ثنائى الخيط كقالب، يمكن أن تؤدى إلى الاقتراح بأن الفيرويدات تكون أخطاء فى الخلية لقطع من ال DNA. هذا يمكن أن يعكس التركيب الاستثنائى والصفات الديناميكية للفيرويدات والتى قد وصفت سابقاً بأنها شبيهة بـ DNA.

فى المعمل فإن النسخ للحمض RNA للفيرويد PSTVd إلى نسخ كاملة الطول بواسطة أنزيم RNA polymerase المعتمد على RNA من نسيج ورقة سليمة قد ذكرت أيضاً. هذا الأنزيم يكون بوضوح مرشح لتناسخ RNA الفيروسى للنبات. لايكون تناسخ الفيرويد فى المعمل مثبطاً بواسطة amanitine - ∝. وبالتالى فإن هذه النتائج سوف لا تشرح الحساسية فى الطبيعة لمادة amanitine - ∝ لنباء الفيرويد الملاحظة فى البروتوبلاست.

الانزيمات الداخلة فى تضاعف الفيرويد Enzymes Involved :

لقد أظهر العالم Rackwitz سنة ١٩٨١ أن أنزيم RNA polymerase II (الذى يعمل على DNA الموجه) المأخوذ من جنين القمح أو من خلايا كالوس أو أوراق خضراء من أنواع طماطم برية **Lycopersicon peruvianum** تكون قادرة فى المعمل على نسخ العديد من قوالب RNA طبيعيا وتخليقياً، مع أنه على كفاءة أقل بمقدار الضعف من كفاءة قوالب ال DNA، ولقد أظهر الباحث أنه فى جميع قوالب ال RNA الطبيعية المختبرة، فإن الفيرويدات تنسخ بكفاءة عالية بواسطة أى أنزيم. إن التحليل بواسطة الهجرة الكهربائية فى الجيل تحت ظروف الدنترة فى منتجات النسخ فى المعمل مع فيرويدات منقاة تستعمل كقوالب كشفت بالإضافة إلى عديد من الجزيئات المكملة للفيرويدات الصغيرة.

باعتبار كل النتائج السابقة نستنتج أن الفيرويدات تتضاعف بطريقة غريبة والتى فيها تكون جزيئات RNA المعدى منسوخة كلية بواسطة أنزيم العائل الموجود سابقاً، وبالتالى فإن هذا الأنزيم يكون عادة RNA polymerase II لحمض DNA الموجه. يبدو واضحاً أن الأنزيم المسئول عن بناء حمض mRNA الموجود مسبقاً تحت ظروف معينة يمكن أن يعمل كأنزيم polymerase أو RNA replicase للحمض RNA الموجه. إن هذا يكون حاثاً على التأمل بأن التركيب الطبيعى للفيرويدات يكون عبارة عن تركيب يشبه DNA ثنائى الشريط والذى يسمح للأنزيمات أن تقوم بعملها بشكل جيد نسبياً بهذه الكفاءة. لقد تبين أن الفيرويدات يمكنها بسهولة أن تشكل معقدات ثنائية مع RNA polymerase II والتى تشترك (تتنافس) مع DNA لعمل قالب لمواقع الربط على الأنزيم، وبالتالى فإنها تثبط وبشدة بناء RNA من DNA الموجه. من هذه الناحية فإن جزيئات الفيرويد المعدية تجند وتجبر RNA polymerase II الموجود فى النواة لتكاثرها الخاص. بالتالى يمكن اعتبار الفيرويدات بأنها أحماض نووية RNA أنانيـة (هـذا ما قاله Lewin سنة ١٩٨١).

لغاية الآن لا يوجد تقارير على بناء الفيرويد باستعمال RNA polymerase رقم I أو III المعتمد على DNA النقى، وبالتالى لا يمكن اعتبارها داخلة فى تضاعف الفيرويد. إن موقع الفيرويدات الناضجة فى النوية سوف تظهر لصالح polymerase I الذى عادة يجرى تناسخ RNA الرايبوسومى فى النوية. إن تماثل التتابع بين تتابع محفز DNA من كائن حى آخر مع التتابعات على النهاية اليمنى فى التركيب الثانوى للفيرويد PSTVd، CSVd أو CEVd قد وجد بواسطة كثير من الباحثين. ومن ناحية أخرى فإن موقع الفيرويدات الناضجة فى النوية لا يستثنى بناؤها بواسطة الأنزيم polymerase II والذى يعرف بأنه موجود فى البلازما النووية أو مترافقاً مع الكروماتين. هذا يمكن أن يكون متوقعاً من المقارنة مع الحمض النووى الصغير U_3 والذى على الأقل فى الخلايا الحيوانية ينسخ بواسطة polymerase II من الكروماتين وبعد ذلك يصبح مترافقاً مع النوية.

المنقبات Probes :

هناك طريقة أخرى لدراسة تناسخ الفيرويد تكمن فى تطوير المنقبات أو جزيئات من المنقبات الخاصة بالفيرويد وتعريف تتابع القواعد فى DNA أو RNA المتعلق بالفيرويد قياساً على الحمض النووى المستخلص من النباتات وذلك بواسطة التهجين الجزيئى.

لقد استعملت ثلاثة أنواع من المنقبات هى:-

١ - فيرويدات نقية معلمة فى المعمل باليود المشع ١٢٥.

٢ - خيط مفرد (محضر فى المعمل) من DNA تكميلى للفيرويد (cDNA).

٣ - خيط مزدوج من الفيرويد ومكمله من ال DNA يحصل عليه بطرق فنية معينة.

فى البداية يمكن القول بأن استعمال الفيرويدات المعملة باليود المشع ١٢٥ كمنقبات فى تجارب التهجين أدى إلى نتائج متضاربة. على أساس مثل هذه التجارب فإن مجموعتين من الأبحاث قد ذكرتا وجود تعاقب مكمل للفيرويد فى DNA الفيرويد المعدى وحتى فى نباتات العائل غير المصابة، لكن الأبحاث اللاحقة أثبتت بوضوح خطأ النتائج السابقة. وبالمثل فإنه فى تجارب التهجين الجزيئى بين cDNA المعلم بالفسفور المشع ٣٢ وفيرويد تقزم الاقحوان CSVd فإن أل Genomes سواء فى العوائل السليمة أو المصابة بفيرويد CSVd لم يلاحظ فيها تطابق فى ترتيب وتعاقب النيوكليتيدات.

وعلى أية حال فإن أى من هذه التجارب لم تستبعد إمكانية أن التتابعات المتعلقة بالفيرويد قد تكون موجودة عشوائياً على كروموزومات العائل أو أن ال DNA للعائل يحتوى على مجموعة صغيرة فقط من جينوم PSTVd. وفى هذه الحالة الأخيرة فإنه من الممكن تصور أن هناك ترتيب قصير من قواعد ال DNA المكملة للفيرويد قد تقوم بعملها كمواقع تمييز وقد تتدخل فى تولد المرض بواسطة

الفيرويد. إنه من الواضح على أية حال أن أى من مثل هذه التتابعات من DNA المتعلقة بالفيرويد لا يمكن أن تعمل كقوالب لبناء أفراد جدد من الفيرويدات، ويصبح بالضرورة أن الفيرويدات يجب أن تتناسخ عن قوالب RNA. وإن هذا التقرير الأخير قد دعم بعدة ملاحظات تدل على أن التركيب الرئيسى للفيرويد لا يتغير بغض النظر عن العائل الذى يتناسخ فيه، وكما هو متوقع من أن الفيرويد الداخل هو الذى يعمل كقالب لبناء ذرية جديدة من الفيرويد وليس DNA الخاص بالعائل.

المركبات الوسيطية فى تناسخ الفيرويد:

Intermediates of Viroid Replication

إن أكثر البراهين إقناعاً على أن RNA الموجه هو المسئول الرئيسى عن ميكانيكية تضاعف الفيرويد تكمن فى النتائج التى حصل عليها عدة مجموعات من الباحثين بأن جزيئات RNA المكملة للفيرويد تتكون فى مستخلصات أحماض نووية من نباتات مصابة ولا تتكون فى مستخلصات الأحماض النووية من النباتات غير المصابة. ويبدو واضحاً أن مثل هذه الجزيئات تمثل مركبات وسيطية فى عملية تناسخ الفيرويد. إن تعاقب RNA المكمل للفيرويد أمكن التعرف عليه لأول مرة فى مستخلصات من نباتات طماطم مصابة بفيرويد CEVd وأوراق نبات-Gynura auran tiaca بواسطة التهجين فى المحلول بمنقب فيرويد معلم بيود مشع ١٢٥. كما أن بعض الأحماض النووية RNAs المكملة للفيرويد أمكن التعرف عليها فى الأجزاء الطافية من كلوريد الليثيوم، ولكن الغالبية العظمى كانت فى الأجزاء المترسبة من كلوريد الليثيوم. لقد ذكر العالم Grill سنة ١٩٧٨ أن RNA المكمل للفيرويد يكون مرافقاً لـ DNA العائل يكون على شكل جزيئات RF (شكل تناسخى) وRI (وسيط التناسخ) وكذلك مرافقاً لجزيئات تكثر فيها مناطق ذات خيط واحد وأخرى طويلة ذات مناطق ثنائية الخيط واحادية الخيط وأخرى على شكل بلمرة بالإضافة إلى تجمعات أو تكتلات ذات وزن جزيئى عال من الجزيئات المكملة للفيرويد، إلا أن الباحث Grill سنة ١٩٨٠ لم يوافق على مثل هذه التصنيفات.

إذا فرض أن الأحماض النووية RNAs المكملة للفيرويد تقوم كقالب ينسخ عنه فيرويدات جديدة فمن الواضح أنها يجب أن تحتوى على تعاقب كامل مكمل للفيرويد، هذا يعنى أنها يجب أن تكون مساوية فى الطول أو أطول من الفيرويد. ونظراً للطريقة غير السليمة التى إتبعها العالم Grill سنة ١٩٨٠ فى تحديد أحجام مكملات الفيرويد لفيرويد CEVd فإنه لم يصل إلى نتيجة فى تحديد حجم مكملات الفيرويد. ويعود الخطأ فى طريقة Grill إلى أنه استعمل RNA غير مدنتر قبل التحليل وكانت تجرى عملية الفصل الكهربائى على الجيل تحت ظروف غير مدنترة.

إن الدليل المقنع لوجود جزيئات كاملة الطول من RNA مكملة للفيرويد حصل عليه بواسطة كل من Owens و Cress سنة ١٩٨٠ فى تجارب-Blot hybridiza tion والتى فيها يستعمل خيط مزدوج من DNA معاد تركيبه كمنقب خاص للفيرويد. إن هذا المنقب قد تم بناؤه عن طريق تحضين polyadenylated PSTVd مع أنزيم النسخ العكسى ويتبع ذلك ازالة قالب الفيرويد بالتسخين. كانت النتائج بأن الشريط المفرد من DNA (الذى هو cDNA تكميلى لفيرويد PSTVd) قد إنقلب إلى cDNA ثنائى الخيط مقاوم لأنزيم S1 nuclease فى تفاعل استعمل فيه أنزيم DNA polymerase 1 للبكتيريا E. coli. إن cDNA الثنائى الشريط المكمل للفيرويد PSTVd بعدئذ قد غرس فى pst I فى مواقع أنزيمات القطع الداخلية للبلازمد PBR 322 عن طريق استعمال اجراءات تعاقبات Oligo (dc) وOligo (dG). إن المقاومة للتتراسيكلين، تحول الحساسية للبنسلين، تحتوى على تتابعات مكملة لـ cDNA الفيرويدى PSTVd المعلم بالفسفور المشع ٣٢ وكلون واحد أعيد تركيبه (pDc - 29) يحتوى ٤٦٠ زوج من القواعد المغروسة فيه. إن هذا الحمض ثنائى الخيط PSTVd cDNA يحتوى مواقع للتقسيم لستة مواقع محددة لانزيمات القطع الداخلى مؤكدة بالتتابع المذكور سابقاً للفيرويد PSTVd. إن نتائج هذه التجارب وغيرها تدل على أن كل التعاقب الكامل للفيرويد PSTVd قد حصل لها كلونة.

إن تجارب التهجين بواسطة بعض المنقبات أثبتت وجود جزيئات RNA فى مستخلصات من خلايا مصابة لها نفس قابلية التحرك (ووزن جزيئى محتمل) كما فى فيرويد PSTVd المستقيم ولكن ذو قطبيه عكسية. إن جزيئات RNA المكملة للفيرويد PSTVd التى لها نفس هذا الحجم قد وجدت بعد معاملة مستخلصات الحمض النووى بأنزيم RNase، دنترة الأحماض النووية RNAs باستعمال الحرارة لمدة دقيقتين على درجة حرارة ١٠٠م فى ٥٠٪ Formamide ثم تبرد وبعد ذلك تحلل بالهجرة الكهربائية بالجيل على درجة ٥٥°م فى وجود ٨ مول يوريا. إلا أن العالم Branch ومرافقوه سنة ١٩٨١ قد ذكروا نتائج تخالف هذه النتائج حيث استعملا أحماض نووية RNAs مدنترة قبل التحليل وإن التحليل بواسطة الجيل كان يفضل تحت ظروف يعرف أنها تمنع اعادة التقوية الكبيرة للحمض RNA.

وعلى العكس من ذلك فإن نتائج التجارب التى أجريت على فيرويد CEVd، فإن cPSTVd كان موجوداً دائماً على وجه الحصر فى الأجزاء الطافية من كلوريد الليثيوم (وزن جزيئى منخفض وخيط ثنائى)، وكذلك فإن النتائج أكدت أن معظم إن لم يكن كل cPSTVd كان موجوداً فى مستخلصات الحمض النووى فى شكل جزيئات مزدوجة مقاومة لأنزيم RNase، هذا يعنى قاعدة مزدوجة مع PSTVd. هذا أمكن تفسيره بواسطة الملاحظات التى تدل على أن إنتاج cPSTVd لم يخفض بشكل كاف إذا أزيلت تقوية RNA - RNA قبل المعاملة بأنزيم RNase.

ولقد أورد بعض الباحثين عدة براهين تثبت أن الخلايا المصابة بالفيرويد تحتوى بالإضافة إلى خيط مكمل للفيرويد كامل الطول تحتوى على جزيئات خاصة بالفيرويد أطول من وحدة الفيرويد الواحدة. إن أول إقتراح يدل على أن مثل هذه الأحماض النووية RNAs القريبة من الفيرويد يمكن أن توجد فى الخلية حصل عليه بواسطة إختبارات Blot hybridization مع مستخلصات حمض نووى من النباتات المصابة بالفيرويد PSTVd، والتى فيها نوعين من RNA يحتويان على

مكمل للفيرويد cPSTVd لوحظ أن هجرتهما أكثر بطئاً من هجرة PSTVd. هذا ما ذكره Hadidi سنة ١٩٨١.

إن جزيئات RNA الخاصة بالفيرويد PSTVd تكون ذات حركة أثناء الهجرة الكهربائية أكثر بطئاً من جزيئات الفيرويد PSTVd الدائرية والمستقيمة، هذا ما لوحظ فى بعض الدراسات والتى فيها استعمل مستخلص حمض نووى من نباتات مصابة بالفيرويد PSTVd والتى استعمل فيها الهجرة الكهربائية على الجيل والتى فيها كانت الجزيئات الخاصة بالفيرويد قد عرفت بواسطة طريقة التهجين Northern bolt التى استعمل فيها منقبات معلمه إما بيود مشع ١٢٥ مع PSTVd أو فسفور مشع ٣٢ مع cDNA. لقد لوحظ سبعة أنواع من cPSTVd، ستة منها تحركت فى الهجرة الكهربائية أكثر بطئاً من الفيرويد PSTVd الدائرى والآخر تحرك تقريباً بنفس سرعة PSTVd الخيطى، إلا أن هذه التجارب قد إنتقدها Hadidi سنة ١٩٨١ وأثبت عدم دقتها.

إن البرهان المقنع على وجود جزيئات من cPSTVd ذات طول أطول من وحدة الطول قد حصل عليه فى دراسة مشابهة لطريقة Blot hybridization والتى فيها إستعمل نظامين من الدنترة الكاملة فى الجيل. لقد ظهرت وعرفت أربعة حزم متميزة من جزيئات cPSTVd . وباستعمال حسابات معينة تبين أن هذه الحزم تحتوى أطوال ٧٠٠، ١٠٥٠، ١٥٠٠ و١٨٠٠ نيوكليتيدة وهذا أدى إلى القول بأنها تمثل مرادفات للفيرويد PSTVd والتى تحتوى ٧١٨ قاعدة (ثنائى)، ١٠٧٧ قاعدة (ثلاثى)، ١٤٣٦ قاعدة رباعى، ١٧٩٥ قاعدة خماسى. لم يمكن التعرف على حزم لوحدة الطول من cPSTVd، قد يكون هذا بسبب التداخل فى التهجين بكميات كبيرة من PSTVd غير المعلمة الموجودة فى RNA من النباتات المصابة متحركة إلى نفس الموقع فى الجيل كما فى cPSTVd الاحادى. إن الدراسات الأنزيمية دلت على أن حزم cPSTVd تتكون على وجه الحصر من RNA موجود فى معقدات محتوية على مناطق ذات خيط مضاعف. وبسبب التعريف الجيد للحزمة من cPSTVd فقد تبين أن حوالى ٤٠ نيوكليتيدة تكون زيادة فى طول

الوحدة الواحدة من PSTVd أمكن ملاحظتها بعد المعاملة بأنزيم $RNase\ T_1$، كذلك فلقد إقترح الباحث أن هناك كمية قليلة من RNA الداخلة فى cPSTVd، يبدو أنها مكونة من مناطق ذات وحدات طول ثنائية الخيط محاطة جانبياً بمناطق احادية الخيط ويبدو أن هذه المناطق الأخيرة تتكون من تتابعات مقاومة لـ $RNase\ T_1$.

وبناء على النتائج السابقة فإن الباحثين إفترضوا أن الحزم التى هى أطول من وحدة الطول الواحدة من cPSTVd تلعب دوراً فى تناسخ الفيرويد وأن معقدات cPSTVd تحتوى مناطق ثنائية الخيط من طول PSTVd تمثل مركبات وسيطية فى التناسخ تدخل فى تركيب حزم cPSTVd بطول تقريباً يساوى طول الفيرويد مكرراً ترادفياً وأن حزم PSTVd الموجودة فى هذه المعقدات تكون مساوية لطول الوحدة الواحدة من الفيرويد. إن هذه الفرضيات بالإضافة إلى الاقتراح بميكانيكية تناسخ الفيرويد بطريقة الدائرة الملتفة كلها كانت إفتراضات أمكن إثباتها وسنتكلم عنها فيما بعد.

هناك أبحاثاً أخرى وهى أيضاً مبنية على الفصل بالتفريد الكهربائى فى الجيل للأحماض النووية RNAs تكون متبوعة بعملية Blot hybridization أثبتت أن التركيب الجزيئى للجزيئات الخاصة بالفيرويد كانت أكثر وضوحاً وإن بعض الأدلة قد أثبتت أن هذه التركيبات هى فعلاً قد تمثل مركبات وسيطية فى تناسخ الفيرويد.

بالاتفاق مع الأبحاث السابقة فإن تجارب Blot hybridization المستعملة منقبات DNA أعيد تركيبها أظهرت أن معظم مكونات الفيرويد هى RNA ثنائى الخيط (وذلك باستعمال مستخلصات RNA من نسيج مصاب) والتى تهاجر فى الجيل أكثر بطئاً من الوحدة الكاملة من PSTVd. إن أكثر الأحماض النوويةRNAs شهرة والتى هى أكثر بطئاً فى الهجرة هما حمضان قد فصل كل منهما عن الآخر بواسطة الكروماتوغرافى السليلوزية والهجرة الكهربائية فى الجيل، وإن

التركيب والحجم والشكل ومكونات PSTVd و cPSTVd لكل منهما قد تحللت فى نظام الجيل والذى لا يحدث دنتره للحمض RNA ثنائى الخيط، ولكن يمنع إعادة التقوية والتركيب للأحماض RNAs المدنترة مسبقاً. إن هذا النظام من الجيل له فوائد أخرى فى فصل الجزيئات الدائرية عن الجزيئات المستقيمة فى PSTVd. إن المكونات ثنائية الخيط المعاملة وغير المعاملة بأنزيم RNase قد حللت بهذا النظام مع أو بدون الدنتره المسبقة. لقد أظهرت نتائج هذه التحليلات أن هناك مركبان كبيران هما أحماض نووية RNAs ثنائية الخيط خاصة بالفيرويد وتهاجر ببطء ذات تركيب قريب الصلة وأنها تتكون من حزم ذات وحدة طول دائرية وخيطية وذات قطبية تشبه PSTVd مختلطة مع حزم RNA أطول من وحدة الطول للفيرويد وعكسية القطبية.

بعد ذلك أجريت تجارب عديدة كانت نتائجها قد بددت السر الذى كان يحيط بميكانيكية تناسخ الفيرويد، وبالرغم من أن هناك إختلافاً فى تفصيل تلك النتائج، إلا أنها كانت تكمل كل منها الأخرى وتميل بوضوح إلى الالتقاء فى مفهوم واحد وفكرة واحدة عن جزئ الفيرويد وميكانيكية تناسخه هذا المفهوم يشمل الفرضيات الآتية:ـ

١ ـ تنسخ الفيرويدات عن RNA تكميلى complementary وليس عن قوالب DNA.

٢ ـ هذه القوالب (RNA تكميلى) بالإضافة إلى الفيرويدات الناشئة (الذرية المتكونة) كلها تبنى بواسطة أنزيم العائل الموجود مسبقاً والأكثر احتمالاً هو أنزيم RNA polymerase II ويقوم بعمله مثل أنزيم Replicase أو كأنزيم RNA polymerase للحمض النووى RNA الموجه.

٣ ـ ينسخ الحمض النووى RNA المكمل للفيرويد من جزئ فيرويد دائرى بواسطة ميكانيكية اللف الدائرى والتى تؤدى إلى تكوين قوالب Multimeric وكميات كبيرة من معقدات تناسخ شبه وسيطية.

بعد هذه المقدمة الطويلة نستطيع أن نقول أن نتائج دراسات التهجين من عدة معامل قد أثبتت أن نباتات العائل سواء كانت سليمة أو مصابة لا تحتوى كميات يمكن التعرف عليها من DNA خاص بالفيرويد. عندما إختبر RNA الموجود فى الخلية للتتابع الخاص بالفيرويد فإن RNA المكمل للفيرويد وجد للفيرويدات CEVd، PSTVd وفى ASBVd. إن الأنسجة المصابة بالفيرويد PSTVd تحتوى RNA تكميلى للفيرويد الكامل. ولقد ثبت نهائياً أن RNA فقط هو الوسيط الداخل فى تناسخ الفيرويد، ولزيادة الوصف للحمض RNA الخاص بالفيرويد فإن التهجين بالمنقبات الخاصة بتتابع الشريط (–) أو الشريط (+) قد إستعمل. إن المنقبات الخاصة بالأشرطة السالبة كانت فيرويدات معلمة باليود المشع ١٢٥ ، أما الشريط الموجب دى اوكسى نيوكليوتايدز، M13 mp 93 ملونة تحتوى تتابع الشريط الموجب. لقد إختبر تتابع الشريط الموجب بشريط دى اوكسى نيوكليوتايد سالب cDNA، معلم بفسفور مشع ٣٢ أو كلونات M13 mp 99 تحتوى تتابع شريط سالب.

إن التحليل بطريقة Northern Blotting للشريط السالب ذو التتابع الفيرويدى أظهر أن الشرائط السالبة من نوع كثير الوحدات (multimers) باثنين إلى خمسة أضعاف طول وحدة الفيرويد، ولقد أمكن التعرف على تتابع أطول من طول وحدة الطول فى فيرويد CEVd، ASBVd. إن الشرائط السالبة لوحدة الطول لا يمكن التعرف عليها بسهولة، وعلى أية حال متى وجد زوج واحد من الشرائط التكميلية فى كميات كبيرة أكثر من الأخرى فإن الشريط الأقل من الصعب أو لا يمكن أن يتعرف عليه بطريقة Northern hybridization.

لقد أمكن التعرف على الشرائط الموجبة قليلة ازواج الوحدات Oligomeric للفيرويدات. فى النسيج المصاب بالفيرويد PSTVd هناك مستوى قليل من ال dimers و trimers وفى النسيج المصاب بالفيرويد ASBVd قد أمكن التعرف على مستويات عالية من ال Oligomers إلى حد eightmers. أما فى

الفيرويد ASBVd فقد وصفت أجزاء دائرية ثنائية مشابهة لتلك الموجودة فىRNA2 فى الكاداغ ـ كاداغ.

إنشطار بوادئ الفيـرويد قليلة الازواج والتحليق فى الفيرويدات

Splitting of Oligomer Viroid Precursors and Circularization of Viroids

إن التركيب الدائرى للفيرويدات يمنحها فائدة القدرة الهائلة على الانتقاء أو الاختيار، نظراً لأن أنزيم ال polymerase حالما يترافق مع RNA يكون عنده القدرة لانتاج نسخاً عديدة الازواج طويلة والتى عندئذ يمكن أن تنشطر إلى نسخ وحيدة (هذا يعنى إلى جزيئات تكون ذات طول يساوى طول وحدة واحدة) . إن الوحدات المستقيمة، على الأقل الشرائط الموجبة يجب أن تتحلق لتشكل فيرويدات ناضجة.

ليس من الواضح تماماً بأى كفاءة تنشطر الوحدات العديدة إلى وحدة طول واحدة من الأحماض RNAs. إن الوحدات العديدة من الممكن أن تحتوى على تركيبات ثانوية مسبقة من وحدات monomers، وبالتالى فإن أنزيم Ribonuclease يمكن أن يحرر هذه الوحدات. أما فى مجال الدراسات التى أجريت على تحكيم الفيرويدات، فإن هناك نوعان من الجزيئات المستقيمة قد عرفت فى تحضيرات الفيرويد PSTVd الدائرى والتى تختلف بوجود فتحة بين C181 و C182 وبين C348 و A349 بالترتيب. على الأقل فإن واحداً من هذه المستقيمات الطبيعية كان يعتقد أنها نتجت من إنشطار بادئ ال multimers. ولأسباب ثيرموديناميكية يجب على الباحث أن يتوقع تركيب لـ multimers يشبه تسلسل التركيبات الثانوية للفيرويد المتطاول. فى هذا التسلسل فإن الفتحة موجودة بين C181 وC182 يمكن أن تكون الواصلة بين التركيبات المتطاولة. إن تجاور كل من C - A قد عرف أيضاً فى RNAs كنقط ضعيفة بشكل خاص، وذكر أيضاً فى بادئ RNA من البكتروفاج T_4 إنشطار ذاتى على هذه المنطقة. بجانب أنزيم Ribonuclease فإن

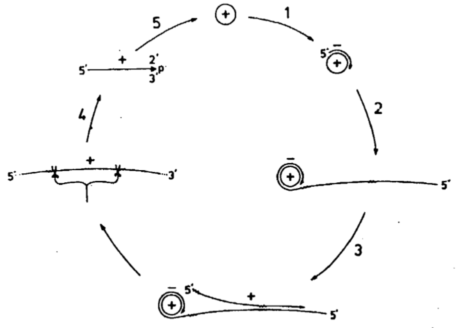
الهضم والتقطيع (الانشطار) الذاتى يتم حتى إتحاد القطع الذاتية وتوصيلها (هذا يعنى وصل ذاتى للقطعة ليشكل وحدات دائرية مباشرة كما هو واضح فى- Pre) rRNA **Tetrahymena)**. ومن ناحية أخرى فإذا كان الانشطار والوصل هى تفاعلات منفصلة فيجب أن يتعرف على أنزيم فى النبات والذى يربط-2`, 3`- cyclophos phate - terminated to 5 - phosphorylated RNA ليشكل روابط-2`- phos phomonoester - 3`,5`- phosphodiester. هذا الأنزيم قد تبين أنه يحلق بكفاءة ما يسمى جزيئات الفيرويد المستقيمة فى وضعها الطبيعى بالإضافة إلى جزيئات الفيرويد التى حدث لها استقامه صناعياً.

أشكال التناسخ Models of Teplication :

إن أشكال تناسخ الفيرويد استنتجت بشكل أساسى من نتائج التجارب والتى عرف فيها التتابعات الخاصة بالفيرويد لأطوال مختلفة وقطبية مختلفة. مع أنه لم يثبت بشكل كامل إلا أنه من المفروض أن الخيوط ال Oligomric الموجبة والسالبة تعتبر وسيطات فى التناسخ إذا قورنت بالمنتجات النهائية وهى تعتبر ملازمة لتقدم المرض. ولقد ذكر Branch & Robertson سنة ١٩٨٤ وصفاً طويلاً لتناسخ الفيرويد.

على أساس الدليل بأن الخيوط السالبة هى ال multimeric للفيرويد PSTVd وعلى أساس تحلق الفيرويدات الناضجة فقد إفترض ميكانيكية الالتفاف الدائرى فى تخليق الفيرويدات وتتم كالآتى: ـ يبدأ بناء الشريط السالب من الشريط الدائرى الموجب المعدى (خطوة رقم ١ فى شكل ٤). تؤدى ميكانيكية الالتفاف الدائرى إلى شريط سالب multimeric (خطوة رقم ٢). عندئذ تسلك الشرائط السالبة multimeric كقالب لانتاج أشرطة موجبة multimeric (خطوة رقم ٣) هذه الشرائط يجب أن تقطع لتعطى جزيئات مكونة وحدة طول واحدة بصفات نهاية المجموعات (خطوة ٤) ثم تتحلق (خطوة ٥) لتنتج ذرية من الدوائر. إن هذا الشكل الافتراضى يطبق على وجه الحصر على أنواع الحمض النووى لخاص بالفيرويد

والذى يمكن بسهولة التعرف عليه فى النباتات المصابة بالفيرويد PSTVd. زيادة على ذلك وكما ذكر سابقاً فإن النشاطات الأنزيمية المفترضة قد وجدت أيضاً فى خلايا النبات، مع أن أى منها لم يبرهن عليه بشكل محدد بأنه يدخل كجزء فى تناسخ الفيرويد فى الطبيعة كما إقترح فى شكل ٤.



شكل رقم ٤:
رسم إفتراضى لتناسخ فيرويد PSTVd. الشكل مأخوذ من Robertson و Branch سنة ١٩٨٤.

لقد تبين من دراسات Bruening et al سنة ١٩٨٢ أن هناك مستويات عالية من الشرائط الموجبة multimeric من ASBVd ومستويات منخفضة جداً من التتابع السالب، وهذا أدى إلى الاستنتاج بوجود ميكانيكية لف دائرى مختلفة. إن الفيرويد ASBVd المخترق للنبات والذى هو monomeric يمكن أن ينقلب بواسطة أنزيمـات العائـل إلى جزئ دائرى سالب والذى عندئذ يعمل كقالب لبنـاء الدائرة الملتفـة من تتابـع ASBVd موجب مستمر والذى يعامل ليعطـى ASBVd monomeric مستقيم كامل الطول بعد ربط ASBVd الدائرى ال monomer السائد.

هناك ميكانيكية ثالثة تشمل التفاف دائرتين. تبنى الشرائط السالبية Multimeric كما فى شكل (٤) ولكنها تعامل لتعطى دائرة monomeric من شريط سالب والذى يعمل كقالب لالتفاف دائرة ثانية لينتج شريط موجب multimers. يؤدى القطع والتوصيل إلى إنتاج ذرارى من الفيرويد.

تناسخ الدائرة الملتفة Rolling circle Replication :

هناك إتفاق عام على أن RNAs فى الفيرويدات تتناسخ بواسطة ميكانيكية الدائرة الملتفة. هناك طريقتين أمكن تعريفهما فى هذا المجال كما فى شكل ٤ ب. فى الجزء الأول من شكل (٤ب) فإن الدائرة الغازية ذات الخيط الموجب تنسخ بأنزيم RNA polymerase المعتمد على RNA ويسمى RNA dependent RNA polymerase ويتكون خيط سالب مرتبط مع بعضه (ملتف) خطوة ١. يحدث فى مناطق معينة إنشطار لهذا الخيط خطوة ٢ تعطى مونومير monomer والذى عندئذ يتحلق بواسطة أنزيم اللحام فى العائل RNA ligase خطوة ٣. يتكون RNA دائرى سالب هذا ينسخ بواسطة أنزيم RNA polymerase خطوة ٤. RNA الموجب المستقيم الطويل ينشطر فى أماكن مخصصة ويكون Monomers خطوة ٥، هذه تتحلق لتعطى الذرية الجديدة RNA دائرى والذى يكون عادة الشكل السائد فى الطبيعة. إن فيرويد واحد هو ASBVd وفيروسايد واحد هو vLTSV ومرافق واحد sTRSV و HDV RNA أكثر احتمالاً لأن تتبع هذا الطريق فى تناسخها.

أما الميكانيكية الثانية فهى فى شكل ٤ب القسم الأيمن. وهى تشبه شكل القسم الأيسر باستثناء أن الخيط السالب الملتف فى الخطوة الأولى لا يحدث فيه إنشطار ولكنه ينسخ مباشرة ليعطى خيط مستقيم موجب (خطوة ٣) والذى ينشطر ليعطى Monomers ثم تتحلق الذرية الناتجة. إن مجموعة PSTVd من الفيرويدات والثلاثة أنواع الأخرى من الفيروسايدات تتكاثر كما فى هذه الطريقة.

إن الدليل على هذه الطرق المذكورة يستند على وجود RNAs السالب الموجب المتحلق فى الأنسجة المصابة ومعلومات مفصلة أخرى مثل وجود RNA ligase فى

النباتات الذى يمكن أن يُحلّق RNAs الفيرويدى المستقيم فى المعمل. كما وان RNA polymerase (s) فى نسخ RNAs السالبة والموجبة لم يمكن تحديدها مع أن RNA polymerases الأول والثانى والثالث (I, II, III) كلها قد استخدمت فى تجارب مختلفة.

الإنشطار المتخصص لـ RNA أثناء تناسخ الدائرة الملتفة

Specific Cleavage of RNA during Rolling Circle Replication

تفاعلات الانشطار فى شكل ٤ يجب أن تكون فى مواقع متخصصة لانتاج Monomeric ونظراً لأن جميع البراهين توضح فى الفيرويدات، الفيروسايدات وجميع مرافقات RNAs الصغيرة لا يمكن أن تشفر لأى بروتينات من الحجم المطلوب لأنزيم Ribonuclease وبالتالى فإن مثل هذا الانشطار يجب أن يتم بواسطة أنزيمات العائل أو بواسطة بعض الميكانيكات غير الأنزيمية كلاهما ذو تخصص عال فى التتابع. من الواضح أنه يجب أن يكون هناك نقطة إنشطار واحدة لكل وحدة Monomeric.

إن الفيروسايدات vLTSV ، vSNMN ، vSCMoV ، vVTMov بالإضافة إلى الفيرويد ASBVd كلها تخضع لتفاعل الانشطار الذاتى فى المعمل فى الغياب الكامل للبروتين. يكون التفاعل عبارة عن إنشطار غير مائى بسيط حيث أن الرابطة داخل النيوكليتيدة تخضع لتفاعل نقـل فسفرة فى وجود Mg^{2+} تهاجـم بواسطة 2`- hydroxyl على الفسفور تقود إلى 2`, 3`- cyclic phosphate على النهاية 3` لواحد من أجزاء RNA المنشطرة و 5`- hydroxyl على النهاية الأخرى. يكون التفاعل أبسط ومختلف تماماً عن العملية غير الأنزيمية للانترونات من بوادئ الرايبوسومال فى Protozoan Tetrahymena حيث Guanosine عامل مساعد يكون مطلوباً والنهايات المنشطرة تحتوى 5`- phosphate و 3`- hydroxyl.

يكون تفاعل الانشطار الذاتى هذا بشكل واضح هو الأساس للانشطار المتخصص المطلوب فى الطبيعة خلال تناسخ الدائرة الملتفة.

العقبة الكبرى التى تعترض هنا هى الميكانيكية التى بواسطتها جميع الفيرويدات التابعة لمجموعة PSTVd تكون قد نشأت من أطول من وحدة طول نواتج تناسخ الدائرة الملتفة. لا يبدو أنها محتوية النيوكليتيدات المحفوظة المطلوبة لتفاعلات الانشطار الذاتى الموصوفة لغاية الآن. هناك محاولات أجريت للحصول على إنشطار ذاتى هام تخصصى فى المعمل إلا أنها كانت غير ناجحة، إلا أن بعض الباحثين استطاع الحصول على انشطار تخصصى معقول لبوادئ من PSTVd وإنتاج monomers دائرية عندما استعمل بوادئ أطول من وحدة طول وحضنها مع مستخلصات أنوية النبات. أخذت هذه النتائج لتدل على أن عمليات الانشاء فى الطبيعة لبوادئ من PSTVd تتطلب عمل أنزيمات RNase التخصصية فى النبات.

بالرغم من هذا الدليل المفصل، إلا أن الميكانيكية الأكثر احتمالاً فى الطبيعة سوف تكون نوعاً من تفاعل الانشطار الذاتى. هناك ثلاثة أنواع من تفاعل الإنشطار الذاتى قد تم تحديدها فعلاً فى ١٢ إنشطار ذاتى فقط لـ RNAs التى تم وصفها لغاية ١٩٩١. تسعة خلال تركيب رأس المطرقة وتركيب غير معروف فى RNA السالب من sTRSV وتركيب آخر غير معروف لـ RNAs الموجب والسالب فى HDV. يبدو من المعقول جداً أن هناك نوعاً آخر من تفاعل الانشطار الذاتى يمكن أن يحسب لمعاملة (بناء) البوادئ فى جميع أفراد مجموعة PSTVd.

تظهر نتيجة الأبحاث المنشورة أن كلونات cDNA المونوميرك PSTVd أو CEVd معتمدة على وجود التتابع فى النهادية`5 للفيرويد المقحم والتى تتكرر بعد النهاية`3 فى هذه القطعة المنغرزة. دراسات أخرى على الطفرات إقترحت بأن مواقع البناء فى بوادئ ال CEVd تحدث فى واحد من ثلاثة مواقع فى الجهة العلوية من النطاق C.

تفاعل الإنشطار الذاتى لرأس المطرقة فى ASBVd

Hammerhead selt - cleavage Reaction in ASBVd

لقد درس هذا الموضوع من قبل كثير من الباحثين منذ سنة ١٩٨٩ وحتى سنة ١٩٩١ وفيما يلى نذكر ملخصاً لهذا الموضوع:-

تحضر نسخاً من RNA سالب وموجب من كلونات cDNA من ASBVd و vLTSV ذات إنشطار ذاتى بصفة تخصصية عالية أثناء النسخ وبعد العزل فى الغياب الكامل للبروتين. يشمل التفاعل Mg^{2+} عامل مساعد لتفاعل نقل الفسفرة الذى يشطر ال RNA ليعطى نهايات ذات 2`, 3`- cyclic phosphate و-5`- hy droxyl شكل (٥). على أساس مواقع متخصصة فى الانشطار يتكشف تركيب رأس المطرقة ثنائى الابعاد محفوظ (شكل ٦) هذا يمكن أن يضاف إلى RNAs ذاتى الانشطار من ASBVd سالب وموجب.

إن تركيب رأس المطرقة لشكل ٦ يتركب من ثلاثة سيقـان زوجيـة القاعدة (III, II, I)حول منطقة احادية الخيط مفتوحة ذات ١٣ نيوكليتيدة (شكل صندوق) والتى تكون محفوظة فى تسعة RNAs ذات إنشطار ذاتى معروفة (لغاية ١٩٩١) والتى تنشطر خلال هذا التركيب. مع أن الدليل الواضح لم يحصل عليه، إلا أنه يبدو من المحتمل أن تفاعل الانشطار الذاتى الموصوف فى المعمل يكون أيضاً مسئولاً عن بناء بوادئ من ال Oligomeric فى الطبيعة.

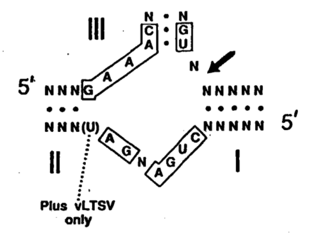
تركيب رأس المطرقة ثنائى الأبعاد كما فى شكل ٦ لا يستطيع أن يشرح بوضوح لماذا يكون هناك إنشطار غير أنزيمى لـ RNAعلى مواقع معينة. من المعتبر أنه فى وجود Mg^{2+}، فإن تركيب رأس المطرقة يتخذ تركيب ثلاثى نشيط والذى يخفض كفاءة الطاقة التنشيطية ويختص بعمله على رابطة النيوكليتيدة الداخلية من مواقع الانشطار الذاتى ليسمح بنقل الفسفرة فى تفاعل الانشطار الذاتى. عند الإنشطار فإن التركيب يتراخى وبالتالى يمنع التفاعل العكسى من الحدوث مع العلم أنه من ناحية نظرية جميع التفاعل يكون منعكس.

أما فى حالة ASBVd فإن التتابعات الداخلة فى تفاعل رأس المطرقة تزودنا بمعلومات عن الخطوة التى تعتبر مفتاحاً فى دورة التناسخ، وهو أيضاً التتابع الوحيد فى هذه الممرضات RNAs. وبالتالى ففى حالة ASBVd فإن مواقع الانشطار الذاتى الموجب والسالب تكون ١٤ نيوكليتيدة منفصلة وأن التتابع فى تركيبات رأسى المطرقة تشمل تقريباً الثلث المركزى لجميع الجزئ.

شكل رقم ٥ :

تفاعل الانشطار الذاتى الذى يشمل تفاعل نقل الفسفرة من

5`- hydroxyl of the 3`nucleotide residue to the 2`- hydroxyl of the 5`residue.



شكل رقم ٦ :

تركيب رأس المطرقة حول منطقة الانشطار الذاتى لفيرويد ضربة الشمس فى الافوكادو ولأربعة فيروسايدات ومرافقات. هناك ١٣ نيوكليتيدة محفوظة فى علبه والنيوكليتيدات غير المحفوظة يشار إليها N.

غياب منتجات الترجمة Absence of Translation Products :

تعتبر الفيرويدات هى الكائنات الوحيدة ذات نظام التناسخ الذاتى والذى لا يعمل شفرة لتناسخه ولا وحدات صغيرة subunit لأنزيم التناسخ الخاص به. مع أنه لايوجد برهان تجريبى نهائى يدل على أن المعلومات الوراثية للفيرويدات لا تعبر عن نفسها فى بروتين صغير، هناك عدة نقاط ذات توضيح سلبى فى مناقشة ذلك.

إن كفاءة الفيرويدات على التشفير يمكن أن تؤدى إلى بروتين ليس أكثر من ١٢٠ حمض أمينى، فمثلاً بالنسبة للفيرويد PSTVd فإن أطول بروتين، يمكن أن ينتج من أكثر من دورتين من الترجمة، شريطة أنه فى هذه الحالة أن مثبطات كودون UGA يجب أن تكبح. إن الافتقار إلى مواقع ربط الرايبوسومات وغياب التركيب القلنسوى، التتابع المجاور مباشرة، ثبات التركيب الثانوى والدائرية كلها لاتناسب نشاط mRNA. أما فى المعمل فإن أنظمة الترجمة لا يمكن التعرف على منتجات خاصة بها إذا كان الفيرويد PSTVd أو CEVd يمكن أن يظهر عمل مثل mRNA. إن المقارنة الدقيقة لنماذج بروتين من نبات **Gynura aurantiaca** المصابة بالفيرويد CEVd ونباتات الطماطم المصابة بالفيرويد PSTVd مع نباتات كنترول متماثلة من نباتات سليمة أظهر بأنه لا يوجد شفرة فيرويدة مختلفة. وباختصار يمكن القول بأن تناسخ الفيرويد يعتمد على أنزيمات polymerase العائل ولا يشفر لنفسه.

دراسة المرض الفيرويدى

١ - المصادر The Sources :

تمتلك بعض الفيرويدات مدى عائلى واسع بشكل واضح، وهذا يعنى أن RNA الفيرويدى يمكن تحضيره ليس فقط من العائل الذى فيه اكتشف الفيرويد اصلاً، ولكن أيضاً من النباتات الأخرى والتى يمكن أن تكون أكثر ملائمة لتحضير الفيرويد. فى كثير من الحالات فإن نقل الفيرويدات إلى عوائل نباتية أخرى لا يؤدى إلى ظهور أعراض معبرة عن الإصابة وبالتالى يجب أن

يستعمل طرق تشخيصية أخرى. ذكرت أنواع كثيرة من النباتات بأنها قابلة للإصابة بفيرويد PSTVd معظمها يتبع العائلة الباذنجانية. كذلك فقد تبين أن فيرويد تقزم قمة الطماطم TASVd يكون مشابهاً لفيرويد PSTVd فى المدى العائلى. أما فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd فإنه يتضاعف ليس فقط فى نباتات الحمضيات ولكن أيضاً فى نباتات العائلية المركبة مثل نبات Gynura aurantiaca وفى نباتات العائلة الباذنجانية. أما فيرويد الاقحوان (التقزم والشحوب المتبرقش) تنتقل فقط إلى أنواع أخرى من العائلة المركبة. أما فيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار يبدو أنه منحصر أساساً فى العائلة القرعية وذكر أنه ينتقل إلى الطماطم. وكذلك فإن فيرويد تقزم حشيشة الدينار يصيب العائلة الباذنجانية، القرعية، التوتية. لقد وجد أن فيرويد ضربة الشمس فى الافوكادو يصيب فقط الافوكادو والقرفه وكلاهما يتبع العائلة الشفوية. إن المدى العائلى لفيرويد كادانج ـ كادانج فى جوز الهند يختلف عن بقية الفيرويدات فى أنه يصيب نخيل جوز الهند فقط وهو الفيرويد الوحيد الذى يصيب نباتات احادية الفلقه.

إن نقل الإصابة الفيرويدية إلى نباتات العائل تحت الإختبار يكون مهماً للدراسات الكيموحيوية وذلك لأن العوائل الاصطناعية فى بعض الحالات تنمو بسرعة أكثر تحت ظروف جوية متحكم بها، وتكون أنسجتها أكثر سهولة فى التعامل لتحضير عزلات من الفيرويد. لقد ثبت بالبرهان العملى أن نباتات الطماطم أكثر ملائمة لتجارب المدى العوائلى. ولقد تبين أن PSTVd و CEVd تخضع لتغيرات بسيطة فقط بعد نقلها من نباتات الطماطم إلى نباتات Gynura.

وكقاعدة عامة فإن التعبير بالأعراض يحدث فى نباتات الطماطم بعد ١٠ ـ ١٤ يوم من الحقن عندما تنمو النباتات تحت كثافة ضوئية عالية ودرجة حرارة مرتفعة٣٠ ـ ٣٥°م خلال النهار وحوالى ٢٠°م خلال الليل. هذه المدة يمكن أن تطول إلى ٢ ـ ٣ شهور إذا نمت النباتات تحت درجة حرارة ٢٠°م. ولقد تبين أن تناسخ الفيرويد وتعبيره بالأعراض يأخذ مجراة تقريباً فى نفس الوقت وأن أفضل إنتاج من RNA الفيرويدى يحصل عليه بعد ٣ ـ ٦ أسابيع من الحقن.

نظراً لأن الفيرويدات تصيب النبات جهازياً فمن الممكن أن تحضر بشكل رئيسى من أى جزء فى النبات. إذا نميت نباتات طماطم مصابة تحت ظروف مثلى فى الصوبا الزجاجية، فإن طريقة التنقية تضم كبريتات السزيوم Cs_2SO_4، آلة الطرد عن المركز عالية السرعة ـ سائل كروماتوغرافى عال الكفاءة HPLC. استعمال هذه المواد يؤدى إلى الحصول على كمية من PSTVd كالآتى: ـ

وزن الجزء النباتى	كمية الفيرويد
$\frac{1}{2}$ كيلو غرام اوراق	٥٠٠ ميكوغرام
$\frac{1}{2}$ كيلو غرام سيقان	٣٠٠ ميكوغرام
$\frac{1}{2}$ كيلو غرام جذور	١٨٠ ميكوغرام

تتم معظم طرق التحضير اساساً من الأوراق، ولكن السيقان يمكن أن تستعمل أيضاً، إذا كان من الممكن عمل مسحوق متجانس منها كما فى حالة نباتات الطماطم.

تستطيع الفيرويدات أن تنمو باستمرار فى المعلقات الخلوية، فى البروتوبلاست وفى مزارع الكالوس كما كان واضحاً فى التجارب على مزارع من الطماطم والبطاطس.

٢ ـ التشخيص Diagnosis :

يكون هناك نوعاً من الالتباس عند تمييز الاصابة الفيرويدية إعتماداً على الأعراض فقط، حتى بعد نقل الإصابة الفيرويدية إلى العوائل المشخصة والنظر إليها نظرة خبير متمرس فى أمراض النبات، فإن التشخيص بواسطة التعرف على الأعراض يكون غير موثوق ولا ملائم بشكل عام. كذلك فإن الفيرويدات لا يمكن تعريفها بالطرق السيرولوجية وذلك بسبب عدم المقدرة على الحصول على أجسام مضادة ضد RNA الفيرويدى بالرغم من المحاولات العديدة التى أجريت بهذا الشأن.

إن التشخيص السليم يتم الحصول عليه بواسطة التعرف على الحزم الفيرويدية فى الهجرة الكهربائية فى الجيل Gel electrophoretic أو بواسطة التهجين الجزيئى. إن طرق الهجرة الكهربائية فى الجيل Gel elecrtophoretic تتضمن الحصول على محلول متجانس من غرام أو بضعة غرامات من النسيج النباتى، مستخلص حمض نووى. فى بعض الحالات تستبعد الأحماض النووية ذات الوزن الجزيئى العال وذلك بواسطة الترسيب فى كلوريد الليثيوم، ثم الترسيب بالايثانول للأحماض النووية الباقية. يحلل المستخلص الخام من الحمض النووى الناتج على مادة polyacryla-mide slab gels. أيضاً يستعمل ٥ ٪ polyacrylamide gels بالنسبة للفيرويدات ذات الوزن الجزيئى لغاية ١٢٠٠٠٠ دالتون (PSTVd) أو ٢,٥ ـ ٣ ٪ للفيرويدات الكبيرة مثل كادانج ـ كادانج. عند إضافة ٨ مول يوريا يحصل على حزم ضيقة. هناك زيادة يمكن ادراكها فى الحساسية وخفض فى الزمن مطلوبة للتشخيص بالهجرة الكهربائية حصل عليها عندما كان السير فى ظروف طبيعية مشتركاً مع سير متعاقب تحت ظروف دنترة فى الهجرة الكهربائية ذات الاتجاهين. هذه الطريقة ادت إلى فصل نقى لجزيئات الفيرويد الدائرية عن جميع الأحماض النووية الخلوية. يمكن أن تستعمل مع مستخلصات خام غير مجزأة كلية. علاوة على ذلك فإن طريقة الصبغ بالفضة أدت إلى الحصول على كمية قليلة تقدر ٦٠ نانو غرام من ال RNA الفيرويدى لكل غرام من نسيج ورقة الطماطم وأعطت ٦٠٠ بيكوغرام فى حزمة مفردة، وفى أبحاث أخرى أعطت ٢ نانوغرام فيرويد لكل غرام من نسيج الطماطم و ٨٠ بيكوغرام فى حزمة مفردة. إن استعمال الهجرة ذات الاتجاهين فى العزل الكهربائى سهلت العمل فى تطبيقات روتينية لكثير من عينات الأنسجة فى وقت واحد.

إن إختبارات التشخيص للفيرويدات المبنية على تهجين DNA تكميلى ذو قوة إشعاعية عالية قد استعملت مع كثير من الفيرويدات وكانت الاختبارات تجرى بواسطة Dot - spot hybridization مع cDNA مكلون cloned للفيرويد

PSTVd ، CSVd ، HSVd أو عن طريق Liquid hybridization مع منقبات cDNA وذلك بالنسبة لكل من RNA فى فيرويد كاداغ ـ كاداغ وفيرويد ASBVd . أما هذا الفيرويد الأخير ASBVd فقد أمكن تعريفه بالتهجين الذاتى-self - hybridiza tion مع RNA للفيرويد نفسه المعلم بالفسفور المشع ٣٢. إن حساسية إختبارات التهجين قد ذكرت بأنها تصل ما بين ٢٠ ـ ٨٠ نانوغرام فيرويد لكل غرام من النسيج المصاب. وبتقدم طرق التهجين وباستعمال منقبات معلمة M13 يمكن زيادة حساسية الإختبار إلى الضعف. يعتبر إختبار الهجرة الكهربائية بالجيل أسرع حيث يحتاج إلى يوم واحد بالمقارنة مع أربعة أيام بالنسبة لطرق التهجين، إلا أن طرق التهجين تحتاج إلى عينات أكثر. تكون طريقة الهجرة الكهربائية فى الجيل حساسة لتركيب فيرويد معينة (الدائرى) كما أنها لا تستطيع التفريق بين تتابعات مختلفة، بينما طريقة التهجين تعرف فقط تعاقبات معينة بغض النظر عن التركيب، وبالتالى فإن كلتا الطريقتين تكمل كل منها الأخرى فى صفاتها.

٣ ـ كلونة الجزئ Molecular Cloning :

فى الوقت الحالى فإن تتابعات الفيرويد المكلون وجدت لها مجالاً كبيراً فى التطبيق فى أبحاث الفيرويد مثل:ـ

أ:ـ التتابع Sequencing .

ب: التهجين لتشخيص الفيرويد، الدراسات التى تجرى لمعرفة المركبات الوسيطية فى تناسخ الفيرويد وإنتشار الفيرويد فى الخلية.

جـ: حيوية cDNA المكلون والمواقع الموجهة للمطفرات.

إن جدول رقم ٤ يلخص الطور الكامل، والكلونات ذات الحجم الصغير مذكورة مع البلازمد، موقع وإتجاه الادخال والمحفزات. بالاضافة إلى الكلونة الجزيئية لكل من CPFVd ، TPMVd ، TASVd .

جدول ٤ : كلونات cDNA لبعض الفيرويدات.

الفيرويد	البلازمو	المحفز	موقع الادخال	الحجم والاتجاه
PSTVd	pGl 101 H	Iac	Hae III 146	monomerid (+) and (-)
PSTVd	pBR 322	tet	Bam H 1 87	monomeric (+) and (-) dimeric (+) and (-)
PSTVd	pBR 322	_	Bam H 1 87	monomeric +
HSVd	pGL 101	lac UV5	Eco R 1 296	monomeric (+) and (-) dimeric (+) and (-) tetrameric (+) and (-)
CEVd	pBR 322	_	Bam H1 87	monomeric (+)
ASBVd	pBR 322	_	_	_

٤ ـ التنقية Purification :

تكمن تنقية الفيرويد فى خطوتين أساسيتين هما:ـ

١ ـ تحضير مستخلص من RNA ذو وزن جزيئى منخفض.

٢ ـ التنقية النهائية للحمض الفيرويدى RNA من هذا المستخلص.

فى معظم الاجراءات فإن الحمض النووى الكلى يستخلص من مزيج النسيج المتجانس بواسطة نظام Buffer / phenol المحتوى على بديل الصوابين SDS وعلى benfonite مثبط أنزيم RNase. تفصل عديدات التسكر وال DNA من ال RNA بواسطة استعمال نظامى الاستخلاص والترسيب بمادة Cetyl trimethyl ammonium bromide. عندئذ يستبعد RNA ذو الوزن الجزيئى العال عن طريق الترسيب باستعمال ٢ مول من كلوريد الليثيوم. بعد ذلك يمكن الحصول على

المحتويات الخصبة من الفيرويد فى مستخلص RNA ذو الوزن الجزيئى المنخفض بعدة خطوات من العملية التى تسمى كروماتوغرامى. هناك طرق حديثة مشابهة لما سبق تستعمل فى تحضير مستخلص خام من فيرويدات HSVd ، TPMVd ، TASVd .

فى بعض الطرق المختلفة فإن مستخلص RNA ذو الوزن الجزيئى المنخفض كان يحصل عليه بعد استعمال كبريتات السيزيوم الكثيفة فى آلة الطرد عن المركز، هذا يعنى أن عديدات التسكر، ال DNA ، RNA ذوات الوزن الجزيئى العال ومكونات أخرى فى النسيج يمكن استبعادها بخطوة واحدة. إن استعمال طريقتى الترسيب باستعمال ٢ مول من كلوريد الليثيوم والترسيب المتعاقب للمواد الطافية باستعمال ٠,٥ حجم من الايثانول يعطى مستخلص RNA خال من أى من ال DNA والRNA ذوات الوزن الجزيئى المرتفع مع بقاء قليل من tRNA. إن ترسيب RNA من محلول عال الملوحة باستعمال تركيز منخفض من الايثانول يمكن أيضاً إستعماله للاستعادة السريعة للحمض RNA ذو الوزن الجزيئى المنخفض من كبريتات السيزيوم المنحدرة إذا ما ضبطت الأجزاء المتماثلة على كثافة نهائية ١,١٨ غم / سم^{٣}.

أما الخطوة الثانية فإن الفيرويدات تنقى من مستخلص RNA الخام إلى الحالة المتجانسة ثم تستعمل طريقة Polyacrylamide gel electrophoresis. ويفضل استعمال هذه الطريقة ذات الاتجاهين (سنذكر ذلك بالتفصيل إن شاء الله فى الفصل الثالث). أو يمكن استعمال هذه الطريقة باستعمال الجريان مرتين، المرة الأولى تحت الوضع الطبيعى أما الثانية فتكون تحت ظروف الدنترة. إن المأخذ على هذه الطريقة Preparative gel electrophoresis هو الكمية القليلة المتحصل عليها من الفيرويد وطول الوقت، يمكن التقليل من هذه العيوب باستعمال عامل التبادل الأيونى وهو الراتنج للاستعمال فى سائل الكروماتوغرافى ذو الكفاءة العالية. لقد أمكن الحصول على ٢٠٠ ميكروغرام RNA للفيرويد PSTVd متجانس من مستخلص خام للحمض RNA (محضر بواسطة كبريتات السيزيوم فى آلة الطرد عن المركز) من جريان مرة واحدة فى الكروماتوغرافى. كانت نسبة الانتاج والتنقية تزيد عن ٩٥٪.

ميكانيكية نشوء المرض (المرضية)

Mechanism of Pathogenesis

هناك تساؤلاً يطرح نفسه على الباحث وهو ما هى الميكانيكية التى بها تحدث الفيرويدات أمراضاً فى عوائل معينة، علاوة على ذلك فإنها تتضاعف (تتناسخ) فى أنواع نباتية أخرى بدون إحداث أضراراً مميزة؟؟.

للإجابة على هذا السؤال هناك ثلاثة تفسيرات قد تكون موضحة لهذا التساؤل وإلا فإن الأبحاث المستقبلية سوف توضح ذلك. هذه التفسيرات هى: ـ

١ ـ إن وجود الفيرويد فى نواة العائل وعدم مقدرته الظاهرة ليعمل عمل mRNA يؤدى إلى القول بأن أعراض المرض المتسببة عنه قد تكون ناتجة عن التداخل أو التفاعل المباشر للفيرويد مع جينوم Genome العائل، هذا يعنى عن طريق تداخله فى التنظيم الجينى فى الخلايا المصابة.

٢ ـ إذا كان التفسير السابق حادثاً بالفعل، فإن الفيرويدات يجب أن تعتبر بأنها جزيئات تقوم بإحداث خلل فى التنظيم الطبيعى فى الخلية أو تقوم بتنظيم غير طبيعى فى الخلية. وإذا كانت الفيرويدات نشأت فعلاً من إنترونات، فإن تأثيراتها الضارة على وظائف خلية العائل قد تكون نتيجة التداخل فى عمليات نضج mRNA.

٣ ـ هناك إقتراحاً ثالثاً لنشوء المرضية بالفيرويد، هذا الإقتراح يفترض بأن الفيرويد يقوم بتجنيد RNA polymerase II للحمض DNA التابع النووى بواسطة جزيئات الفيرويد المعدى وذلك لاستكمال أو إنجاز تناسخه (الانانية فى التناسخ)، ويثبط أو يكبح بناء mRNA's جينومى فى خلية العائل وبالتالى يعوق أو يفسد عمليات التمييز أو التخليق فى الخلية.

يجب أن نؤكد على أن جميع هذه التفسيرات هى عبارة عن إقتراحات إلى حد بعيد ولكى يكون أى من هذه التفسيرات الثلاثة المذكورة سابقاً معقولاً يجب أن لاينظر إلى نتيجة الإصابة الفيرويدية الملاحظة وهى الأعراض، ولكن أيضاً يجب النظر إلى الحقيقة المذكورة سابقاً وهى أنه فى بعض الأنواع النباتية فإن الفيرويدات تتناسخ بشكل كاف دون احداث ضرر واضح مميز على العائل، وفيما يلى بعض المعلومات قد تلقى بعض الأضواء على هذا الموضوع.

١ - علاقة المرض مع البروتينات والمركبات الأخرى:

كما ذكر سابقاً فإنه لم يوجد فيرويد يعمل شفرة لبناء البروتين. وعلى أية حال فإنه فى نسيج مصاب بالفيرويد CEVd من نبات **Gynura aurantiaca**، طماطم والبطاطس، فإن هناك نوعان من البروتينات ذات أوزان جزيئية تتراوح ما بين ١٢ - ١٨ ألف دالتون، تتراكم فى النسيج. وفى نسيج نبات الطماطم المصاب بالفيرويد PSTVd وجد بروتين ذو وزن جزيئى ١٤ ألف دالتون، وهذا كان وجوده بتركيز أعلى فى النباتات المصابة عنه فى النباتات السليمة، إلا أن هذه البروتينات ليست متخصصة بالاصابات الفيرويدية، ولكنها تظهر أيضاً بعد الإصابة الفيروسية وفى النباتات الطبيعية التى وصلت طور الشيخوخة. قد ينظر إلى هذه البروتينات على أنها إستجابة فسيومرضية Pathophsiological للنبات العائل. كذلك ذكر حدوث بعض التغيرات بعد حدوث الإصابة بالفيرويد، فى التركيز الكلى للأحماضDNA ، RNA والبروتينات وفى المحتوى والتركيز للعناصر المعدنية وفى تركيز حمض الكلورجنك. هذا يدعم التفسير الأول الذى ذكر سابقاً.

٢ - تماثل التتابع مع الأحماض النووية RNAs الصغيرة:

عند إجراء دراسات حول الفيرويدات والأحماض النووية الصغيرة RNAs (U1 - U6) فى الكائنات الحية الدقيقة مميزة النواة، أمكن التعرف على بعض التماثل فى تتابع النيوكليتيدات هذا التتابع كان واضحاً بشكل جيد.

إن الأكثر وضوحاً فى هذا المجال هو تماثل التتابع بين النهاية`5 فى U1 RNA والمنطقة الأكثر حفظاً فى الخيط السفلى فى التركيب الثانوى (سيذكر ذلك بالتفصيل إن شاء الله فى الفصل الثالث) فى الفيرويدات من مجموعة PSTVd. وبالاعتماد على الأبحاث اللاحقة فإن U1 RNA يتدخل فى عملية التراكب splicing (سبق ذكرها) والتى فيها تقطع الانترونات من الحمض النووى RNA غير المتجانس ويتكون mRNA المطلوب. فى هذه الأشكال فإن النهاية`5 من U1 RNA تشكل أزواج قواعد بنهايتين من الانترون. ويعتقد أن الفيرويد يمكن أن يحل محل U1 RNA ويتدخل فى عملية التراكب، وأيضاً يعتقد أن خيط الفيرويد السالب يتفاعل مع ويوقف عمل U1 RNA. إن تكوين دبابيس الشعر (فى تركيب الفيرويد) يمكن أن تكون ناتجة عن مثل هذا التفاعل أو أن دبابيس الشعر الثابتة يمكن أن تناسب هذا التفاعل. وفى أشكال مختلفة من PSTVd يمكن أن يحدث تفاعل بواسطة منطقتين غير متجاورتين مع مواقع التراكب فى mRNA للعائل. هناك مناطق مشابهة ولكن غير متماثلة تماماً وتكون أيضاً موجودة فى العزلات المعتدلة من الفيرويدات PSTVd و CSVd. إن الأعراض غير الشديدة فى الاقحوان والتى تظهر بعد الإصابة بثلاثة فيرويدات تكون فى حالة توازى مع التفاعل المتوقع للفيرويدات مع مواقع التراكب على الأحماض mRNAs.

وعلى أية حال فإن تواجد الفيرويدات الناضجة فى النوية ووجود U1 RNA فى أجزاء الرايبونيوكليوبروتين تبطل الشكل المذكور سابقاً فى نشوء المرض. فقط فإن الحمض النووى الصغير RNA U3B المعروف بأنه موجود فى النوية. وكذلك وجد أن تتابع متماثل بين PSTVd و snRNA U3B من خلايا No-vik off hepatoma قد وجد فعلاً فى النوية. لم يمكن التوصل إلى أشكال (من هذه المذكورة) تساهم فى نشوء المرضية تشبه هذا التماثل.

٣ ـ إختلاف التتابع Sequence Variation :

إن تتابع النيوكليتيدات فى سلالات الفيرويد ذات الاختلافات فى تعبيراتها بالأعراض المرضية قد حددت لكل من PSTVd ، CEVd . أما فى هذا الأخير فإن الأعراض الناتجة عن عزلات مختلفة لا يمكن تقسيمها من المعتدلة إلى البقع الميتة ولا يمكن أن تفسر فى اصطلاحات محددة تماماً متضمنة مناطق الشدة على الفيرويد. يمكن أن تصنف الأعراض بسهولة من المعتدلة إلى أعراض البقع الميتة وإن الاختلافات فى التتابع يكون محدوداً على الجزء الكبير من التركيب الثانوى المتكون بواسطة النيوكليتيدات ٤٠ ـ ٥٥، ٣٠٥ ـ ٣٢٠ وإلى مقدار بسيط حول النيوكليتيدات ١١٥ ـ ١٢٥ . إن العالم Sanger وتلاميذه قد إقتنعا بأن الاختلاف الكبير يؤثر فى الشدة وذلك عن طريق تغيير الثبات الثيرموديناميكى لتلك المنطقة، وأن الاختلاف القليل يعدل بحيث يحدث توازناً مع العدد الكلى من النيوكليتيدات والتى هى ٣٥٩ لجميع السلالات. تقع المنطقة ذات الإختلاف البسيط المرنة من ال Oligopurine. ولقد تبين أن هذه المنطقة هى واحدة من المناطق ذات الثبات الثيرموديناميكى المنخفض جداً والذى يمكن أن يخضع إلى عملية التفكك المسبقة. إن تقدير الثبات الحرارى لهذه المناطق المتفككة مسبقاً ينتج العلاقة التى تقلل الثبات، هذا يعنى كلما كان هناك زيادة فى إظهار التفكك المسبق يكون هناك زيادة فى الشدة يتبع ذلك.

٤ ـ cDNA المكلون للفيرويد المعدى Infectious Viroid cDNA Clones :

لقد ذكر العالم Owens سنة ١٩٨١ أن DNA للبلازمد المحتوى cDNA dimers للفيرويد PSTVd كانت معدية. عندما ينسخ RNA من هذه البلازميدات وعندما يحتوى التتابع لـ PSTVd تكون أيضاً معدية. إن التتابع فى ذرية الفيرويد و DNA المكلون كانت متماثلة. أما عن الحيوية فلم يمكن إظهارها بالبلازميدات المحتوية monomers للحمض cDNA للفيرويد PSTVd. لقد تمكن Ohno et al

سنة ١٩٨٣ فى المعمل من بناء جزيئات RNA معدية من cDNA مكلون للفيرويد HSVd. لقد ذكر Meshi et al سنة ١٩٨٤ حتى الخيوط المزدوجة من cDNAs تحتوى من ١ ـ ٣ وحدات من تتابع الفيرويد HSVd بدون محفزات promoters كانت معدية. كانت حيوية تتابع الوحدة الواحدة منخفضة، لكنها وجدت فى cDNA الذى أُخذ من قطع فى دائرة الفيرويد فى مواقع مختلفة. كما أن الباحثين قد توقعوا أن وحدة الطول الواحدة cDNA من يمكن أن تلتحم مع Dimers فى النباتات المصابة قبل أن يبنى RNA معدى.

لقد أكد جميع الباحثين الذين يعملون على cDNA المكلون الفيرويدى المعدى على أن تتابع الفيرويد يمكن أن يحدث فيه تغير بواسطة مطفرات تعمل مباشرة على المواقع المخصصة لذلك، وهذا يمكن أن يستعمل كأداة مؤكدة لدراسة ميكانيكية نشوء المرضية وتناسخ الفيرويد.

ونستطيع أن نختم هذا الموضوع بالفقرة التى ذكرها العالم Symons فى مقاله المنشور فى مجلة Virlology عدد واحد صفحة ٨٠ لسنة ١٩٩٠ حيث قال:

بالرغم من معرفتنا الكبيرة عن تتابع الفيرويدات وتركيبها وتفهمنا الزائد لتناسخها، إلا أننا بشكل أساسى لا نمتلك الادراك الحقيقى لكيفية حدوث الأعراض من قبل الفيرويدات. ونظراً لأن الفيرويدات لا يبدو بأنها تشفر لأى بروتين أو عديد ببتايد، فمن المحتمل أنها تمارس تأثيرها خلال تتابعها والتركيب الثانوى والثلاثى Tertiary structure، حيث أن هذه الصفة وهذا التركيب تتداخل بشكل خاص مع واحد أو أكثر من مكونات الخلية. إن كفاءة الفيرويدات لتتداخل مع بعض الأحماض النووية RNAs فى الخلية له أهمية ونتائج كبيرة.

ومن ناحية أخرى فإن أهمية تداخل الفيرويدات وطرق هذا التداخل مشروحة باسهاب كبير من قبل العالم Sanger فى بحثه سنة ١٩٨٨.

مقارنة بين الفيرويدات وبعض الكائنات الأخرى

١ ـ مقارنة بين الفيرويدات والفيروسات: ـ

كما سبق وذكرنا فإن الفيرويدات هى كائنات صغيرة ذات وزن جزيئى منخفض من الحمض النووى RNA والتى تستطيع أن تهاجم خلايا النبات وتكاثر أنفسها اعتماداً على نفسها وتسبب أمراضاً للنبات. تختلف الفيرويدات عن الفيروسات فى بعض الصفات هى: ـ

أ ـ حجم الحمض النووى RNA. إن حجم هذا الحمض فى الفيرويدات له وزن جزيئى صغير يتراوح ما بين (١١٠٠٠٠ ـ ١٣٠٠٠٠) دالتون. أما فى الفيروسات فيكون وزنه الجزيئى من مليون إلى عشرة ملايين دالتون.

ب ـ الصفة الثانية وهى حقيقة أن الحمض النووى RNA الفيروسى أو أل DNA يكون مغلفاً بغطاء بروتينى، بينما الفيرويدات لا يوجد عليها غطاء بروتينى، وتوجد بوضوح بدون غطاء بروتينى يعنى أنها حمض نووى حر ليس عليه غطاء.

جـ ـ تتابع النيوكليتيدات ووجود النطاقات فى الفيرويدات تختلف عنه فى الفيروسات.

د ـ الفيروسات تستطيع أن تشفر للبروتين أما الفيرويدات فلا تستطيع.

هـ ـ تتناسخ الفيرويدات ويزداد عددها بطرق مختلفة عن التى تتبعها الفيروسات.

و ـ تظهر أعراض الأمراض الفيروسية بعد فترة حضانة تقل كثيراً عن التى تحتاجها الأمراض الفيرويدية حيث أن بعض الأمراض الفيرويدية تحتاج إلى سنتين بعد الحقن لتظهر الأعراض على العائل.

ز ـ الفيروسات تهاجم النباتات الراقية والحيوانات والفطريات والبكتريا أما الفيرويدات لم يعرف حتى الآن أنها تهاجم غير النباتات الراقية.

وإن جدول رقم ٥ يبين بعض الفروق بين الفيروسات والفيرويدات والكائنات الدقيقة.

جدول رقم ٥: بعض الفروق بين مسببات مرضية

الصفة	الكائنات الحية الدقيقة	الفيروسات	الفيرويدات
النمو	يحدث فيها نمو	لا يحدث نمو	لا يحدث نمو
الانقسام	تنقسم	لا تنقسم	لا تنقسم
التطفل المطلق	غير مطلقة التطفل	مطلقة التطفل	مطلقة التطفل
نوع الحمض النووى	RNA و DNA	RNA أو DNA	RNA
الوزن الجزيئي للحمض النووى	أكبر من ٣×١٠^{٨}	$٣ \times (١٠^{٦} - ١٠^{٨})$	$(١,١ - ١,٣) \times ١٠^{٥}$
التغليف	غير قابل للاستعمال	مغلف مع بعض الاستثناء	غير مغلف
تشفير للبروتين	تشفر	تشفر	لا تشفر

٢ ـ مقارنة بين الفيرويدات والفيروسايدات:

Comperison of Viroids and Virusoids

تعتبر الفيروسايدات Virusiods من مرافقات RNAs النباتية. حيث أن هذه المرافقات تقسم إلى مجموعتين:

المجموعة الأولى: مجموعة مغلفة توجد بشكل دائرى مثل الفيرويد ويوجد ضمن هذا الغلاف فيروس مساعد. ويوجد من هذه المجموعة أربعة أفراد معروفة وتسمى Virusiods (يعنى فيها RNA شبيه بالفيرويد Viroid - like RNAs) واعطيت هذا الاسم لتمييزها عن المجموعة الأخرى.

المجموعة الثانية: مجموعة مغلفة وتوجد بشكل مستقيم وتسمى مرافقات RNAs أو Satellite RNAs ويعرف من هذه المجموعة واحد فقط ويسمى sTRSV وقد درس جيداً.

جميع أفراد هذه المرافقات تتكاثر بميكانيكية الدائرة الملتفة. فى حالة sTRSV الأشكال الدائرية تكون موجودة فى النباتات المصابة ولكن فقط الشكل المستقيم هو الذى يختار ويكون مغلفاً مع جزيئات الفيرس.

إن مرافق RNA الحيوانى الوحيد والذى يشارك صفات الإنشطار الذاتى فى المعمل والمفترض تناسخه بالدائرة الملتفة والانشطار الذاتى فى الطبيعة مثل المرافقات النباتية هو فيرس دلتا الكبد hepatitis ويسمى Hepatitis delta virus (HDV) RNA. وإن هذا ال RNA الدائرى يتكون من ١٧٠٠ نيوكليتيدة وحجمه خمسة أضعاف RNA فى النبات ويكون مغلفاً على شكل أجزاء فيروسية منفصلة عن RNA الفيروسى.

ويبين جدول رقم ٦ مرافقات RNAs التى تخضع للانشطار الذاتى.

جدول رقم ٦: مرافقات RNAs التى تخضع للانشطار الذاتى

	الفيرس المساعد	الاسم باختصار	طول النيوكليتيدات
النباتات ١ ـ RNAs شبيه بالفيرويد مغلفة Virusoide	أ ـ فيرس التخطيط المتنقل فى البرسيم الحجازى Lucerne transiend strak virus	vLTSV	324
	ب ـ فيرس التبرقش العقدى فى البطاطس Solanum nodiflorum mottle virus	vSNMV	377
	جـ ـ فيرس تبرقش البرسيم الأرضى Subterranean clover mottle virus	vScMov	332 & 388
	د ـ فيرس التبرقش القطيفى فى الدخان Velvet tobacco mottle virus	vVTMoV	365 - 360
٢ ـ RNA مستقيم مغلف	فيرس البقعة الحلقية فى الدخان Tobacco ringspot virus	STRSV - sTobTSV	359
٣ ـ الحيوان RNA دائرى مغلف لفيرس دلتا الكبد	Hepatitis B virus	HDV RNA	1,700

إن الصفات الخاصة للفيرويدات يمكن ملاحظتها جيداً عند إجراء مقارنة مع جزيئات RNA الشبيهة بالفيرويدات مثل الفيروسايدات virusoids، الأحماض النووية RNAs الدائرية ذات الحجم المشابه المحتوى المماثل من GC ولكن بشكل عشوائى مثل التتابع المخلق بالكومبيوتر. إن تتابع النيوكليتيدات والتركيب الثانوى لاثنين من الفيروسايدات تختلف عن فيروسايد vTMOV فيرس التبقع المخملى (القيطفى) فى الدخان، وفيرس تبقع نبات **Solanum nodiflorum** (SNMV). إن درجة تزاوج القواعد يكون ٥٦ ٪ فى vTMoV و ٥٧ ٪ فى SNMV وقيمة متوسطة من ٥٧ ٪ حسبت من أقرب ما يمكن من التركيب الثانوى لخمسة تتابعات مختلفة عشوائية. هذا ويظهر أن درجة تزاوج القواعد فى بعض الفيرويدات ٦٤ ٪ فى CCCVd ليست أعلى بكثير من الفيروسايدات أو التتابعات العشوائية. إن غياب التشعبات صفة مميزة والتى هى من مميزات الفيرويدات. كذلك فإن هناك صفة مميزة أخرى هى الثبات الثيرموديناميك، وهى إما أن توضح بواسطة $\Delta G / N$ أو بواسطة قيمة Tm. إن التعاون الممثل بواسطة $\Delta T1/2$ يكون فقط عال فى التراكيب المقطعية للفيرويدات. وأن تكوين دبوس الشعر الثابت خلال تكون تركيب مقطعى مترافق يحدث فقط فى الفيرويدات.

ماذا عن الفيرويدات الحيوانية

Question of Animal Viroids

مع أن الفيرويدات قد عرفت تماماً بأنها تصيب النباتات الراقية، إلا أن هناك عوامل مشابهة قد توجد فى أشكال الحياة الأخرى. يبدو من المعقول البحث عن الفيرويدات فى كثير من الحالات التى فيها مسببات الأمراض يفترض أنها فيروسية ولكن العامل المسبب لم يتأكد تعريفه. وبكلمة أدق يمكن البحث عن الفيرويدات فى الأمراض التى يشك فى أنها تتسبب عن فيروسات.

هناك أمراضاً كثيرة تصيب الإنسان والحيوان وتعزى إلى فيروسات ولكن العامل

المسبب الحقيقى مشكوك فيه، من هذه الأمراض، المرض شبه الحاد من التهاب الدماغ وبعض أمراض الالتهابات المفصلية، ومرض سكرابيا Scrapie فى الحيوانات، يشك فى أنها تتسبب عن فيرويدات.

على أساس مقارنة الصفات المعروفة عن فيرويد PSTVd وصفات العامل المسبب لمرض سكرابيا تبين من ناحية نظرية أنه يتسبب عن فيرويد، لكن من ناحية عملية لم يثبت بشكل قاطع أنه يتسبب عن فيرويد.

إن المحاولات التى بذلت لعزل الحمض النووى المعدى من عينات الدماغ التى أخذت من الحيوانات المصابة بالمرض باءت بالفشل. كذلك فإن الادعاءات التى تقول إن هناك DNA منخفض الوزن الجزيئى مكون أساسى وضرورى لظهور أعراض مرض سكرابيا لم تتأكد. ومن ناحية أخرى فإن هناك أدلة مقنعة على أن وجود hydropobic protein فى العامل المسب للمرض يكون أساسياً للتعبير عن حيوية العامل الممرض. إلا أن نفس الباحثين لم يكونوا قادرين على إثبات المتطلبات الضرورية من الحمض النووى لإحداث المرض.

لقد ذكر كثير من الباحثين أن مرض سكرابيا هو محل خلاف كبير. إن مسبب المرض شديد العدوى، ثابت ظاهرياً، غير صعب فى تنقيته ويبدو أنه مقاوم للإجراءات العادية لتنقية العوامل المعدية. ولقد ذكر أن هناك أدلة وافرة لثبات سلالاته الوراثية مع المتطلبات التالية من جينوم حمض نووى. وعلى أية حال فإن المحاولات للتأكد المطلق من وجود أو عدم وجود الحمض النووى فى المادة المنقاه جيداً لحد الآن لم يكتب لها النجاح.

عند مقارنة العامل المسبب لمرض سكرابيا مع الفيرويدات من حيث صغر الحجم والمقدرة على إحداث أعراض واضحة فى العوائل القابلة للإصابة، والوقت الطويل الذى يحتاجه بالمقارنة مع الفيروسات، أصبح هناك إحتمالاً من أن يكون عامل المرض يحتوى على جينوم شبيه بالفيرويد.

إن الصعوبة فى اكتشاف حمض نووى فى تحضيرات سكرابيا المختلفة النقية يمكن أن يكون راجعاً إلى الوزن الجزيئى المنخفض جداً لجينوم سكرابيا. وإذا كان هذا المسبب المرضى يتكون من جزئ دائرى ٥٠ نيوكليتيدة، فإن تناسخ الدائرة الملتفة لهذا ال RNA سوف يولد جزيئات concatameric والتى يمكن أن تكون الشكل الوظيفى للمادة الوراثية. زيادة على ذلك فإن الانشطار الذاتى الجزيئى لهذه ال concatamers يمكن أن تولد جزيئات أصغر بأطوال مختلفة كل منها ينجز وظيفة مختلفة إلى حد ما بسبب إختلاف الطول.

بعد كل هذا من الممكن أن نتخيل جزئ RNA دائرى صغير جداً يبدو قادراً على إحداث تأثيرات Phenotypic معنوية كتتابعات لتكاثر concatameric RNAs مختلفة، مثل هذه ال RNAs يمكن أن تتداخل مع العمليات الطبيعية الخلوية بطرق مشابهة لتلك التى تقوم بها الفيرويدات. إن جميع المعلومات المتوفرة عن مسبب مرض سكرابيا تسمح بأن يكون من ناحية نظرية فيرويد، ولكن هذا التأكيد يحتاج إلى أبحاث طويلة حيث أن العمل على هذا المسبب قد بدأ فى سنة ١٩٧٤ ولغاية ١٩٩٢ لم يتأكد الموضوع.

فرضية Diener: هل الفيرويدات مستحثات (بقايا) جزئ من عالم RNA

Are Viroids Molecular Fossils of the RNA World

لقد تقدم العالم Diener سنة ١٩٨٩ بفرضية يقول فيها إن الفيرويدات عبارة عن مستحثات أو بقايا جزئ من عالم RNA. وإن هذه الفرضية لاقت معارضات كثيرة من قبل كثير من الباحثين، إلا أن هناك من وافق عليها وقدم الأدلة والبراهين على صحتها. وفيما يلى نعرض التقرير الذى تقدم به J. C.Flores سنة ١٩٩٤ وفيه يؤكد صحة فرضية Diener ويدعمها بالبراهين والاثباتات.

تقرير العالم J.C.Flores :

نحن نناقش اعتراضاً قد ارتفع ضد فرضية العالم Diener والذى يقول فيها أنه يمكن تفسير ظهور الفيرويدات على أنها جزئ مستحاث من عالم RNA. نحن سلكنا طريقاً سليماً لازالة مثل هذا الاعتراض ونكون بذلك قد عضدنا وساندنا فرضية Diener. وعلى أية حال فإن استنتاجاتنا تستلزم زيادة فى العمل من قبل علماء أمراض النبات فى هذا الموضوع. يبدو أن هذه الفرضية لها أهمية من ناحية بيولوجية ومن ناحية تطورية.

مقدمة :-

١ - عالم RNA :

هناك بعض الافتراضات التى وضعها كثير من العلماء حول عالم RNAوكانت هذه الافتراضات ناجحة فى كثير من الحالات وقد قمنا بتلخيص هذه الافتراضات وهى كالآتى: -

أ- ازدواجية الفينوتايب والجينوتايب لـ RNA :

إن هذه الجزيئات الكبيرة جداً من RNA تعتبر بأنها تقوم بالعملين فى تجارب تطور الخلية الحرة. إن تتابع النيوكليتيدة فى القواعد يكون ال Genotype، بينما التركيب الفراغى أو الحيزى لجزئ ال RNA هو ال Phenotype، ويمكن الاستفادة من الشرح الذى ذكر عن التركيب الثالثى Tertiary المعروف جيداً لـ tRNA مع الانتيكودونات Anticodons .

ب - التطور لأنواع ظاهرية إلى حد ما جديدة على طول أنابيب الجيل يزودنا بأمثلة من الحيز الاختيارى Spatial selection فى أعمال كثير من العلماء.

جـ - إن التراكب الذاتى Self - Splicing فى Protozoan genomes يمكن أن يفسر كأنه بقايا من عالم ال RNA، ومن الضرورى أن نذكر فى هذا

المجال أنه عند تتبع سلسلة مراحل التطور، هذا يؤدى إلى التعرف على أصل الحياة وإن عالم RNA إعتماداً على هذه المعلومات يظهر أنه قد تطور متأخراً. يمكن القياس على أعمال العالم De Duve سنة ١٩٩١ عندما بحث فى عالم Thioester وعالم ال Pyrophosphate. وعلى أية حال إذا تركنا المراحل الأولى من عالم ما قبل النيوكليتيدة إلى عالم النيوكليتيدة، فمن الممكن أن نلمح إشارات مفيدة لا يزال يستدل بها على مستحاثات الجزئ موجودة فى الخلايا المعاصرة.

٢ ـ إن ال RNAs الممرضة للنبات يمكن أن تكون بقايا من التطور ما قبل الخلوى:

فى هذا المجال يمكن أن نقوم بتلخيص إقتراحات العالم Diener والتى يقول فيها إن ال RNAs الممرضة للنبات تتصف بأنها دائرية صغيرة يمكن أن تكون بقايا من التطور ما قبل الخلوى. ونؤكد هذا الكلام بقولنا إن الفيرويدات قد درست جيداً خاصة تلك التى لها أهمية فى الزراعة منذ ظهور تأثيرها الأول على العائلة الباذنجانية خاصة **Solanum tuberosum** (البطاطس)، فمثلاً إن أول فيرويد عرف هو فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd وفيه ٣٥٩ نيوكليتيدة (Diener 1971). وإن أول تتابع للنيوكليتيدات الكاملة فى الفيرويد قد حدد أيضاً فى PSTVd سنة ١٩٧٨ من قبل العالم Gross.

من هذا يتبين أن هناك ثقة واسعة لصالح تفسير الفيرويدات كجزئ مستحاث. بعد ذلك ظهر هناك آراء معارضة كثيرة تفند هذه الفرضية وتطلب توضيحاً على استفساراتها. وقبل أن نذكر الآراء المعارضة فإننا نقوم بتوضيح بعض النقاط التى تدعم البراهين التى تؤيد بأن الفيرويدات هى بقايا من عالم RNA هذه النقاط هى: ـ

أ ـ طول الفيرويدات القصير ٢٤٦ ـ ٣٧٥ نيوكليتيدة.

ب ـ بعض الفيرويدات يحدث فيها ظاهرة الانشطار الذاتى الذى فيه تحدث ظاهرة مثيرة للاهتمام. إن أنزيمات العائل RNase لا تتدخل. فعلاً فإن عملية الانشطار الذاتى تحدث فى الغياب الكامل للبروتينات. ومن ناحية أخرى ففى حالة الفيرويدات غير ذاتية الانشطار، فإن بعض العوامل أو الوسطاء تتدخل فى ذلك. من الممكن أن يكون RNase تتزود به الفيرويدات من قبل خلايا العائل.

جـ ـ إن البناء الداخلى للفيرويـدات يعطيها ميكانيكية دفاعية، نظراً لأنها تتكون مـن دوائر أحادية الخيط مع وجود ازواج قواعد عديدة تسمح لهذا ال RNA ليشكل حلزون ثنائى كامل بأبعاد تجعل الفيرويد مقاوم للأشعة UV.

د ـ إن تتابع النيوكليتيدات فى الفيرويدات يبرز قليلاً من النشاط لـ RNA أو لا يظهـر أى شـئ من هذا النشـاط فى الفيرويد PSTVd، فمثلاً هناك stop codons متكررة فى كل القراءات للاطار العام للفيرويد.

الآراء المعارضة لنظرية Diener والرد عليها

١ ـ التناقض الظاهرى لهذه الفرضية:

هناك تناقض ظاهرى ينشأ من الفرضية التى تقول بأن الفيرويد قد يكون جزئ مستحاث من عالم RNA. إن الفيرويدات فى إحداثها المرض متخصصة مع نباتات مغطاة البذور فقط. إن هذه النباتات قد ظهرت فوق سطح الأرض فى العصر الطباشيرى فمن المفترض حسب رأى Diener أن الفيرويدات يجب أن تكون ظهرت مع مغطاة البذور منذ تلك الفترة، ولكن هذا لا يؤيده الواقع.

إن أقدم مستحثات لمغطاة البذور يؤرخ من نهاية العصر الجيولوجى المتوسط ١٠٠ ـ ١٤٠ مليون سنة قبل ظهور الأوراق الحالية وحبوب اللقاح الحالية. كذلك فإن

التقارير التى تتكلم عن أجزاء التكاثر فى مغطاة البذور تؤرخ من العصر الطباشيرى المتأخر وهى فى فترة Turonion ، كذلك فإن الترسبات القديمة للنباتات المتحجرة كانت قبل العصر الطباشيرى وبعده بمدة طويلة جداً أنتجت تركيبات تكاثرية. وبالتالى فإن عالم ال RNA قد ظهر أولاً على الأقل فى الدهور السحيقة إذا لم يكن قبل ذلك. اعتماداً على هذا الكلام فمن المفروض أن الفيرويدات بقايا من الدهور السحيقة (3.3 - 3.9 Gybp)، إلا أن الأقرب للصحة أنها متخصصة للحياة فى فترة العصر الطباشيرى وخاصة على مغطاة البذور.

للرد على هذه المعارضة يجب أن نطرح السؤال التالى.

أين كانت هذه الأجزاء المحافظة على حياتها منذ الدهر السحيق قبل أن تصبح متخصصة على النباتات فى العصر الجيولوجى المتوسط نسبياً؟؟.

مع أن طرق إحداث المرضية من قبل الفيرويدات ليست واضحة تماماً، إلا أن إحدى هذه الطرق الممكنة وقد اعتمدها كثير من الباحثين وهى إحداث تغير فى مستويات البروتين فى خلية العائل قد يكون مسئولاً عن إحداث الأعراض عند الإصابة، أو يمكن أن يحدث تحورات فى البروتين بعد نسخه فى خلية العائل، فمثلاً، بواسطة عملية Phosphorylation. إن الاحتمالين المذكورين سابقاً، إلى حد ما، قد يكونا من خصائص البكتيريا الزرقاء كطور من مراحل الحياة الحرة لبدائيات النواة، إلا أن هذا لم يتأكد حتى الآن، ولكن الذى تأكد هو أن الفيرويدات متخصصة فى خلايا النبات الذى فيه الكلوروبلاست عبارة عن عضيات organelles نشأت من البكتيريا الزرقاء عن طريق التكافل. نحن نتذكر هذا الافتراض ونعتمد عليه بالاعتماد على نظرية التكافل الداخلى المتسلسل Serial endosymbiosis theory، بأن بعض الكلوروبلاست نشأت خلال مرافقة ال polyphyletic بين البكتيريا الزرقاء المختلفة أسلاف خلايا مميزة النواة.

٢ ـ البحث عن البكتيريا الزرقاء المميزة:

فى هذا الموضوع، بين الاختيارات المختلفة المتوفرة فى البحث عن البكتيريا الزرقاء المميزة يجب أن نذكر أن صفة الفيرويدات ذات التضاعف الموجب بسبب أنزيمات العائل تؤدى إلى الاقتراح بأن Cyanobacteria RNA replicase قد استكشف من وجهة النظر هذه (هذا يعنى أن RNA - polymerase المعتمد على RNA الذى يمكن أن يكون مسئولاً عن تضاعف الفيرويد، من الآن فصاعداً نشير إلى هذا البروتين باسم العامل X. نحن لا نملك إلا القليل من المعلومات عن طرق تناسخ البكتيريا الزرقاء باستثناء الهستونات شبيهة بالبروتينات ذات الحجم المشابه لبروتينHU فى E. cloi.

لكى نرد على هذا الاعتراض يجب أن نستذكر تسلسل فرضيات التكافل الداخلى Endosymbiosis. يجب أن نفترض أن الاسترقاق Holobionts (متكافل Symbionts وعائل hosts) الأول يستفيد من العائل ولا يقدم للعائل أية فائدة، هى أهداف جديدة للانتخاب الطبيعى بسبب التداخل بين المشاركين فى التكافل، فى هذه الحالة فإن المشارك قوة رائدة مهمة جداً فى التطور، وهذا دعم بأسانيد قوية من كثير من الباحثين. مثل هذا التداخل بين العوائل والمتكافلين يمكن، مثلاً، أن يكون إنتقال وراثى أو متكافل مشارك مثل العضيات Organelles.

نرجع ثانية إلى العلاقة مع الفيرويدات فإن الاحتمالات المتوقعة والقائمة تكمن فى:

بعض الانزيمات المعروفة فى نسخ الفيرويدات مثل (QB replicase). بعض التكافل بين الخلايا البكتيرية التى تمتلك فعلاً جينومات مخفضة، فمثلاً الكائن **Cyanophora paradoxa** وحيد الخلية ذو أسواط، يوجلينا تأوى Cyanelles والتى تكون مثل البكتيريا الزرقاء متكافل ينقصه جدران الخلية وتكون له كلوروبلاست عاملة. ولقد عرفت ال Cyanelles بأنها تمتلك ١٠٪ فقط من

محتويات ال DNA في البكتيريا الزرقاء غير المتكافلة. هذه المتكافلات الداخلية من بدائية النواة يمكن أن تقترب من الطور الذى وصل إليه بواسطة الكلوروبلاستس الذى يرجع بناء بروتينها الذى فصل. ولكن كثيراً من هذه البروتينات شفرت بواسطة جينات نووية.

والذى يهمنا هنا احتمال واحد ومهم أن نذكره هو أنه في فرضيتنا أن- Viroid Containing cyanobacteria وتكاثر الفيرويد يكون بسبب العامل X، بعد التكافل فإن الفرد المتكافل يمكن أن يمتلك جينوم أصغر كثيراً كما في Cyanelles. الفيرويدات يجب عليها أن تعتمد على جينوم العائل لبناء عامل X.

هذه إثباتات نظرية وبقى على علماء أمراض النبات أن يثبتوا ذلك عملياً بالتطبيق على أمراض النبات والعوائل القابلة للإصابة منذ العصر الجيولوجى الأول إلى هذا الزمن.

مراجع خاصة بالفصل الثانى

1 - Agrios, M. J. 1987. Plant Pathology. Acedemic Press. 800 pp.

2 - Branch, A. D., Robertson, H. D., Dickson, E. 1981. Proc, Natl. Acad Sci U. S. A. 78: 6381 - 6385.

3 - ——— A. P., ——— 1984. Science 223 : 450 - 455.

4 - Bruening, G. et al. 1982. FEBS Lett. 148 : 71 - 78.

5 - Diener, T. O., Smith, D. R. 1975. Virology 63 : 421 - 427.

6 - ——— , ——— 1989. Proc. matn, Acad. Sci U. S. A. 86 : 9370 - 9374.

7 - D. Duve, C. 1991. Blueprint for a cell: The nature and origin of life, Neil Patterson Publishers.

8 - Grill, L. K., et al. 1980. Virology 107 : 24 - 33.

9 - ———, ———, Semancik, J. S. 1978. Proc. Natl. Acad Sci U. S. A. 75 : 896 - 900.

10 - Gross, J. H., Domedy, H., Lossow, C. 1978. Nature 273 : 203 - 208.

11 - ——— , ——— , ——— 1981. Biosci, Rep., 1 : 235 - 241.

12 - Hadidi, A., Cress, D. E., Diener, T. O. 1981. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 78 : 6932 - 6935.

13 - Haseloff, J., Symons, R. H. 1981. Nucleic Acids Res. 9 : 2491 - 2452.

14 - Lewin, R. 1981. Science 213 : 634 - 636.

15 - Meshi, T. et al. 1984. J. Biochem., 95 : 1521 - 1524.

16 - Muhlabach, H. P., Sanger, H. L. 1979. Nature 278 : 185 - 188.

17 - Ohne, T., Takamatsu, N., Meshi, T., Okado, Y. 1983. Nucli Acid Res. 11 : 6185 - 6197.

18 - Owens, R. A., Cress, D. E. 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 5302 - 5306.

19 - Owens, R. A., Diener, T. O. 1981. Science 213 : 670 - 672.

20 - Rackwitz, H. R., Rohde, W., Sanger, H. L. 1981, Nature 291 : 297 - 301.

21 - Riesner, D., et al. 1979. J. Mol. Biol. 133 : 85 - 115.

22 - Semancik, J. S., Tsurnda, O., Zaner, L. 1976. Virology 47 : 456 - 466.

الفصل الثالث

الدراسات الحديثة للفيرويدات

تصنيف ـ نطاقات ـ تنوع التتابع وتشخيص الفيرويدات

classification - Domains - Sequence Variants and Diagnosis of Viroids

أولاً: ـ تصنيف الفيرويدات Classifcation of Viroids :

ظهرت آراء كثيرة فيما يتعلق بتصنيف الفيرويدات وسواء صنفت الفيرويدات تحت الفيروسات أم لا فإن ذلك يعتمد على التعريف الدقيق والمقبول لكلمة فيرس Virus . وبالتالى فإن التعريف الذى ذكر فى الطبعة الثالثة من كتابGeneral Virology الصادر سنة ١٩٧٨ لمؤلفه Luria et al والذى يرى فيه أن التركيب الذى أقل من الخلية والذى يمتلك طور حيوى معدى يتمثل بشكل خاص فى الفيرونات وهذه الفيرونات تنتج تحت نظام وراثى لا يختلف عنه فى الفيرس، والنظام الوراثى فى الفيرس يختلف عنه فى الفيرويد، اعتماداً على ذلك فإن الفيرويدات لاتقع فى هذا المجال من التعريف وبالتالى لا تدرج فى التصنيف تحت الفيروسات.

ومن ناحية أخرى فإن العالم Lwoff سنة ١٩٨١ يرى أن الفيروسات هى كائنات ذات قدرة حيوية على إحداث العدوى وذات قدرة على إحداث المرض وهى طفيليات مطلقة بكل ما فى الكلمة من معنى. وقد أكد فى تعريفه للطفيليات المطلقة على أنها تلك الطفيليات التى تستخدم النظم الأنزيمية لخلايا

عوائلها فى إنتاج الطاقة (نظام Lipmann) وبناء البروتين وتستخدم رايبوسومات خلايا العائل وكذلك tRNAs للعائل. حسب هذا التعريف فإن الفيرويدات تكون فيروسات بشكل واضح.

بغض النظر عن أى من هذين التعريفين هو الأصح، إلا أن هناك إختلافات واضحة بين الفيروسات التقليدية والفيرويدات. مع أن العالم Lwoff ذكر فى تعريفه للفيرويدات بأنها أنواع من الفيروسات، إلا أنه إقترح تقسيم مملكة الفيروسات إلى مجموعتين، الأولى الفيروسات الحقيقية The True Viruses أو Euviruses والثانية الفيرويدات Viroids.

إن العالم Lwoff إعتمد فى تقسيمه على درجة وطبيعة التطفل ولم يضع فى إعتباره عمق االاختلافات بين الفيروسات والفيرويدات. من الملاحظ أنه إذا كانت الفيروسات طفيليات مطلقة فى رأى العالم Lwoff، فمن الممكن اعتبار الفيرويدات فوق التطفل المطلق Ultra - absolute parasites (يعنى أكثر من تطفل مطلق)، وذلك لأنها تعتمد إلى حد بعيد وكبير (زيادة عن الفيروسات) على آلية البناء الحيوى لخلايا عوائلها. مع أن الفيروسات تحتوى بشكل ثابت معلومات وراثية والتى بمساعدة النظام البنائى لبروتين العائل فإنها يمكن أن تترجم (فى طور واحد أو أكثر من دورة تضاعف الفيرس) إلى واحد أو أكثر من البروتينات الخاصة بالفيرس، إلا أن الفيرويدات يبدو أنها لا تمتلك هذه الكفاءة. وبالتالى فإن الفيرويدات حتى يحدث لها تضاعف فإنها يجب أن تعتمد كلية على أنزيمات موجودة بشكل طبيعى فى خلايا عوائلها. وبالتالى يمكن القول بأن الفيرويدات هى الكائنات الممرضة الوحيدة المعروفة التى لا تعمل شفرة لأى بروتينات.

بعد تلك المناقشة مع العالم Lwoff تبين له ضعف وعدم دقة إقتراحه بتصنيف الفيرويدات كأنها فيروسات وزاد هذا الاقتراح ضعفاً عند معرفة التركيب الجزيئى الفريد والغريب للفيرويدات والذى ليس له نظير بين الفيروسات، هذا التركيب الذى جعل أى علاقة تطورية بين هذين الكائنين الممرضين الفيروسات والفيرويدات فى قفص الاتهام.

يعتبر التتابع القاعدة الأساسية لمقارنة الفيرويدات (تتابع النيوكليتيدات فى خيط الـ RNA) مع بعضها البعض. إن تتابع المنطقة المركزية المحفوظة يسمح لجميع الفيرويدات الموصوفة (التى درست) بأن تصنف إلى أربعة مجموعات. الإختلاف الذى يقع ضمن كل فيرويد ينسب إليه الأنواع وإن الأساس الذى يعتمد عليه فى التفريق بين التنوع Variants والنوع Species، هو أنه فى التنوع يكون هناك تشابه فى التتابع بحدود ٩٠ ٪، أما فى النوع Species فإن تشابه التتابع يكون أقل من هذا المستوى.

إعتماداً على هذا الأساس من التقسيم صنفت الفيرويدات إلى مجموعتين رئيسيتين وثلاثة تحت مجموعة.

لقد وضع Koltunow & Rezaian سنة ١٩٨٩ أساس تصنيف الفيرويدات اعتماداً على مقارنة تحليل التتابعات فى الفيرويدات ويوصى باستعمال جدول رقم ٧. حيث تقسم الفيرويدات إلى مجموعتين رئيسيتين A و B وإن فيرويد ASBVd هو الذى يمثل في مجموعة A، لأن هذا الفيرويد لايظهر بشكل أساسى أية علاقات تتابع مع أى من الفيرويدات الأخرى، مع أنه من المعقول جداً أن هناك أفراداً أخرى من هذه المجموعة (وقد وضع فيرويد الموزايك الكامن للخوخ فى هذه المجموعة) وسوف تكتشف أفراداً أخرى مستقبلاً.

تقع الفيرويدات الأخرى كلها ضمن المجموعة B والتى تسمى مجموعة Pospivroids. هذه المجموعة يمكن أن تقسم إلى ثلاثة تحت مجموعات هى B_1 ، B_2، B_3. إن تحت المجموعة B_1 يمثلها الفيرويد PSTVd وتحتوى ١٥ فيرويد بدأت معرفة أولها منذ عشرين عاماً، مع أن بعضاً منها مثل CTiVd، CLVd قد عرف تتابعها حديثاً سنة ١٩٨٨ ــ ١٩٨٩. كل هذه الفيرويدات تمتلك تتابع محفوظ وصفات تركيبية فى القمة المركزية للخيط فى جزئ الفيرويد. أما تحت المجموعة B_2 الذى يمثلها ASSVd وتسمى مجموعة Apscaviroids فهى تحتوى ثمانية فيرويدات والتى قد وصفت حديثاً. هذه الفيرويدات تتشارك فى مسافة (قطعة) كبيرة من تماثل التتابع خاصة ضمن المنطقة المركزية لجزئ الفيرويد والذى هو الأساس فى وضعها فى مجموعات.

إن أحدث الفيرويدات وصفاً هو فيرويد CbVd (Columnea blumei Viroid) وهو أيضاً واحداً من أصغر الفيرويدات به ٢٤٨ نيوكليتيدة إكتشف سنة ١٩٩٠ يصيب الكوليس. إن تتابعه غير متعلق بشكل أساسى مع أى من الفيرويدات، ولكن صفات منطقته المركزية تشابه لتلك الصفات الموجودة فى عدد من أفراد تحت المجموعة B_1، B_2 وبالتالى فإنه وضع فى تحت مجموعة جديدة هى B_3.

جدول رقم ٧ : تصنيف الفيرويدات

مجموعة الفيرويد	تحت مجموعة الفيرويد	اسم الفيرويد بالتفصيل	اسم الفيرويد مختصر	عدد النيوكليتيدات فى الفيرويد
مجموعة A أو	تحت مجموعة	Avocado Sunblotch Viroid	ASBVd	٢٤٧ (٢٥٠ _ ٢٥١)
Avsunviroids	ASBVd	Peach Latent Mosaic Viroid	PLMVd	٣٣٧
مجموعة B أو	تحت مجموعة	Potato Spindle tuber Viroid	PSTVd	٣٥٩
Pospiviroids	B1	Citrus Exocortis Viroid	CEVd	٣٧٠ _ ٣٧٥
	أو تحت مجموعة	Citrus Viroids	CVd	٢٧٥ _ ٣٤٠
	PSTVd	Coconut Cadang - Cadang Viroid	CCCVd	٢٤٦ _ ٢٤٧
		Coconut Tinangaja Viroid	CTiVd	٢٥٤
		Chrysanthemum Stunt Viroid	CSVd	٣٥٤ _ ٣٥٦
		Chrysanthemum Chlorotic Mottle V.	ChCMVd	———
		Hop Stunt Viroid	HSVd	٢٩٧ _ ٣٠٣
		Hop Latent Viroid	HLVd	٢٥٦
		Tomato Planta Macho Viroid	TPMVd	٣٦٠
		Tomato Apical Stunt Viroid	TASVd	٣٦٠
		Tomato Bunchy Top Viroid (Indian)	ITBTVd	٣٧٢
		Cucumber Pale Fruit Viroid	CPFVd	٢٩٧
		Nematanthus Viroid	CLVd	٣٧٢
		Cloumnea Latent Viroid	CLVd	٣٧٠
مجموعة	تحت مجموعة	Apple Scar Skin Viroid	ASSVd	٣٣٠
Apscaviroids	B2	Dapple Apple Viroid	DAVd	٣٣٨
	أو تحت مجموعة	Apple Fruit Crinkle Viroid	AFCVd	٣٤٠
	ASSVd	Pear Blister Canker Viroid	PBCVd	٣١٥
		Citrus Bent Leaf Viroid	CBLVd	———
		Australian Grapevine Viroid	AGVd	٣٦٩
		Grapevine Yellow Speckle Viroid - 1	GYSVd-1	٣٦٧
		Grapevine Yellow Speckle Viroid - 2	GYSVd-2	٣٦٣
	تحت مجموعة	Coleus Yellow Viroid	CYVd	٢٤٨
	B3	Coleus Blumei Viroid	CbVd-1	٢٤٨

ملاحظات:

١ ـ فيرويدات الحمضيات لها تصنيف لوحدة فى الجزء الثانى من الكتاب.

٢ ـ الفيرويد المسبب الثمرة الباهتة فى الخيار، تنقر الثمرة فى الخوخ والبرقوق يعزل من الحمضيات والعنب.

٣ ـ يعتبر فيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار تنوع تابع لفيرويد حشيشة الدينار.

بالإضافة إلى الفيرويدات المذكورة فى جدول رقم ٧ هناك عدة فيرويدات تحت الدراسة وهذه الفيرويدات هى:

1 - Burdock stunt Viroid.
2 - Pear Rusty Skin Viroid.
3 - Apple Scar Skin latent Viroid.
4 - Nicotiana glutinosa Strnt Viroid.
5 - Carnation stunt Viroid.
6 - Wheat Leaf Blight Viroid.
7 - Privet Viroid.
8 - Oil Palm Fatal Viroid.
9 - Pigeon Pea Mosaic Mottle Viroid.
10 - Dapple Fruit Viroid of Plum and Peach.
11 - Nematanthys Viroid.

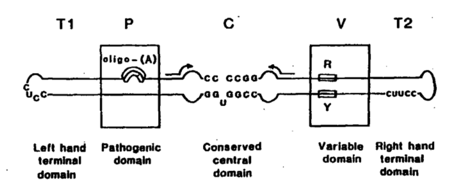
إن تحليل مقارنة التتابع فى النيوكليتيدات لتسعة عشر فيرويداً قد تم تحديد تتابعاتها وهذا يسمح بتصنيفها إلى مجموعتين كبيرتين. مجموعة A تحتوى فرد واحد لغاية سنة ١٩٩٢ وهو فيرويد ضربة الشمس فى الافوكادو ASBVd وهو ثانى أصغر الفيرويدات المعروفة وهو الوحيد لغاية ١٩٩٢ الذى يحدث له إنشطار فى المعمل ثم أضيف إليه فيرويد أخر. الفيرويدات الباقية فى مجموعة B وتسمى مجموعة PSTVd - group B وهذه تقسم إلى تحت مجموعات ثلاثة هىPSTVd sub - group B_1 والثانية ASSVd - sub - group B_2 والثالثة CbVd sub - group B_3 .

الأسس التى بنى عليها تصنيف مجموعة B هى وجود تتابعات محفوظة فى الجزء المـركزى لجـزئ الفيرويـد. فى نموذج النطـاق للفيرويدات شكل ٧، فإن جميع جزيئات الفيرويد فى PSTVd مجموعة B يكن أن تقسم إلى خمـسة نطاقات هى T_1 ،P، C، V وT_2. وإن حدود هذه النطاقات قد حددت بواسطة مقارنة التتابع للفيرويدات فى أزواج. إن التغيرات الشديدة فى تماثل التتابع من الأعلى إلى الأقل أو العكس يبين مواقع الحدود والتى كانت دائماً ثابتة مع مقارنة الأزواج المختلفة. إن نموذج النطاق كان قد تكشف باستعمال تتابعات الفيرويد فقط من تحت مجموعة B_1 لـ PSTVd بسبب أن أفراد هذه المجموعة كانت

متوفرة فى ذلك الوقت. وعلى أية حال فإن فيرويدات تحت المجموعة B_2 التابعة لـ ASSVd أيضاً تمتلك نفس النطاقات كما حددث بواسطة نفس البحث وهو المقارنة الزوجية لتماثل التتابع.

إن تحت مجموعة B_2 من ASSVd قد فصلت عن تحت مجموعة B_1 على أساس التتابع فى نطاق C. إن المنطقة المحفوظة المركزية ضمن نطاق C لكل تحت مجموعة فيها تتابعات بحوالى ٣٠ نيوكليتيدة وهى محافظ عليها بشكل كبير بين جميع أفراد تحت المجموعة والتى تمثل حوالى ثلث مجموع النيوكليتيدات فى نطاق C. بشكل أساسى لا يوجد هناك تماثل بين هذه الثلاثين أو ما يقاربها فى تحت المجموعتين وهذا يشكل الأساس فى تحت التقسيم. أما تحت مجموعة B_3 فهى لا تزال تحت الدراسة وتشمل فيرويدين.

يؤدى نموذج النطاقات إلى الاقتراح بأن نشوء الفيرويدات يشمل إعادة ترتيب النطاقات بين الفيرويدات المهاجمة لنفس الخلية. سوف نتكلم عن النطاقات بالتفصيل فى صفحات لاحقة إن شاء الله.



شكل رقم ٧ :

نموذج لخمسة نطاقات فى مجموعة PSTVd. حدود نطاقات T_1 ، P ، C ، V ، T_2 محددة بتغير ملحوظ فى تماثل التتابع فى ازواج القواعد بين الفيرويدات. الاسهم تدل على التتابع المتكرر المقلوب والذى يمكن أن يشكل ساق دبوس شعر مكون من تسعة قواعد زوجية. هذا دبوس الشعر رقم واحد.

فيرويدات مجموعة PSTVd :

هناك ١٥ فيرويداً معروفاً وحددت تتابعاتها بالتفصيل فى هذه المجموعة، تقسم هذه الفيرويدات إلى ثلاثة تحت مجموعات (جدول ٧) وذلك مبنياً على تحليل التتابع المقارن للمنطقة المركزية لكل جزئ. إنه من المحتمل أن يكون هناك أكثر من تحت قسم Subdivision ضمن كل تحت مجموعة، يمكن أن يكون هذا أكثر احتمالاً كلما زاد عدد الأفراد ضمن كل تحت مجموعة ووصفت جيداً. فمثلاً CCCVd و CTiVd مع أنها تشترك فقط فى ٦٤٪ من عموم تماثل التتابع، إلا أنها متقاربة جداً إلى حد ما على أساس كل من التتابع وتنظيم التتابع، صغر حجم جزيئات الفيرويد، المدى العائلى المحدود فى عائلة النخيل ومستوى منخفض من تماثل التتابع الكلى مع الفيرويدات الأخرى من تحت المجموعة الخاصة بها. هناك أمثلة أخرى فى تحت مجموعة B_1 ليس محددة جيداً أيضاً.

كما سبق وقلنا فإن تقسيم أفراد هذه المجموعة إلى ثلاثة تحت مجموعات قد أعتمد على النطاق الفيرويدى Domain.

مميزات مجموعة ASBVd . فيرويد ضربة الشمس فى الافوكادو:

بالإضافة إلى عدم وجود تشابه من حيث التتابع والصفات التركيبية مع الفيرويدات الأخرى، إلا أن هناك صفات أخرى مميزة، هى مقدرة كلتا الخيطين الموجب والسالب للحمض RNA للفيرويد ASBVd لأن يخضع إلى تفاعل كامل من التقطيع الذاتى والذى يعتبر بأنه يلعب دوراً أساسياً فى تناسخ الدائرة الملتفة لهذا الفيرويد. يحدث تفاعل التقطيع الذاتى هذا فى المعمل على مواقع معينة (لكنها مختلفة) فى الحمض النووى RNA السالب والموجب فى الغياب الكامل للبروتين، ولكن فى وجود Mg^{++} ليعطى RNA مقطع بنهايات من-2`, 3`- Cyclic phos-phate و 5`- hydroxyl شكل (٥). أما فى المعمل فإن تفاعل التقطيع يعتبر هو المسئول عن تقطيع ال monomers السالب والموجب من التكرر الترادفى لـ monomeric الخيوط السالبة والموجبة والتى تنتج باستمرار خلال تناسخ الدائرة الملتفة.

إن المميزة الهامة للتقطيع الذاتى للفيرويد ASBVd السالب والموجب والذى يشارك بواسطة أربعة فايروسايدات معروفة (الدائرية، شبه الفيرويد، RNAs التوابع) و RNA الموجب للحمض RNA التابع لفيرس البقعة الحلقية فى الدخان، هى وجود ١٣ نيوكليتيدة محفوظة والتى يمكن أن ترتب فى تركيب يشبه رأس المطرقة (شكل ٦) حول منطقة التقطيع الذاتى.

التركيـب المجمل لشكل ٦ يحتوى ١٣ نيوكليتيـدة محفوظـة (شكل صندوق) مع سيقان مكونة من ثلاثة ازواج من القواعد كمـا هو فى الشكل تأخذ I ، II، III، حول منطقة مفتوحة مركزية تحتوى على شريط واحد من RNA. هذا التركيب نشأ من تسعة RNAs ذاتية القطع والتى وصفت لغاية الآن والذى يكون التقطيع الذاتى خلال تركيب رأس المطرقة هذا.

إن التركيب ثنائى الأبعاد لا يفسر بوضوح تفاعل القطع الذاتى الخاص العال. يمكن الاعتقاد بأنه فى وجود Mg^{++} يتكون تركيب ثلاثى نشيط والذى يسمح بالخفض فى الطاقة التنشيطية فى نقطة التقطيع الذاتى، وبالتالى فإن تفاعل نقل الفسفرة شكل ٥ يمكن أن يحدث. مع أن تفاعل القطع الذاتى من ناحية نظرية منعكس إلا أنه لم يلاحظ إطلاقاً مع الفيرويد ASBVd. الممكن إفتراضه أنه طالما تحدث عملية الانشقاق الذاتى فإن التركيب الثالثى المنشط يسترسل (يرتخى) وبالتالى فإن نهايات `5 ,`3 لا تكون أطول من مجاوراتها ولا يحدث التفاعل العكسى.

من الممكن التنبوء بأن أفراداً جديدة لمجموعة ASBVd (كما هى قد أكتشفت) سوف تحتوى تتابعات عامة وصفات تركيبية واحداً منها سيكون كلا الشريطين السالب والموجب فى RNAs لينقطع ذاتياً خلال تركيب رأس المطرقة. لا يوجد أى فـرد من فايرويـدات مجموعـة PSTVd يمتلك بشكـل مقنـع صفـة الانشطار

الذاتى، ولكن هناك فقط محاولات محدودة أجريت لغاية الآن للبحث عن مثل هذا التفاعل. يبدو من المحتمل تماماً أن هذ الفيرويـدات سوف تكون أيضاً ذاتية الانشطار ولكن سوف يكون عن طريق ميكانزم مختلف نظراً لأن تركيب رأس المطرقة يحتوى ١٣نيوكليتيدة محفوظة لا يمكن أن تتشكل من تتابع هذه الفيرويدات.

ثانياً: ـ النطاقات Domains:

المقصود بالنطاقات هو تقسيم جسم الفيرويد المستقيم إلى عدة مناطق كل منطقة مميزة عن الأخرى فى تتابع نيوكليتيداتها وفى وظيفتها وفى صفاتها، ودراسة هذه النطاقات لها فوائد كثيرة من حيث التصنيف ومن حيث نشوء الفيرويدات. من حيث التصنيف ذكرنا جزءاً منه سابقاً وسنكمل بعد ذلك. أما من حيث أهميتها فى نشوء الفيرويد، فإن نموذج النطاق يؤدى إلى الاقتراح بأن نشوء الفيرويدات يشمل إعادة ترتيب النطاقات بين الفيرويدات المهاجمة لنفس الخلية. إنه من الصعوبة بمكان إيجاد دليل محدد لدعم هذا الاقتراح. إن الميكانيكية المحتملة لمثل إعادة الترتيب هذه يكون بعدم استمرارية النسخ حيث RNA polymerase ينسخ قالب فيرويد واحد ينقلـب لينسخ قالـب ثانى يضعه بجانبه فى بعض النقاط الأكثر احتمالاً ليتحدد بواسطته التركيـب الثالثى للفيرويد. مثـل هذا النموذج يدعم المضاعفة الجزئية التى تحـدث فى نطاق T_2 للفيرويد CCCVd وبإعـادة الترتيب للحمض RNA والذى يحدث لانتاج فيرس حيوانى من RNAs ناقص التداخل.

إن زيادة تفهمنا عن تتابع النطاقات فى الفيرويدات يسمح بزيادة قربنا المنطقى إلى علاقة وظائف التركيب ضمن واحد أو أكثر من النطاقات.

نموذج النطاق لمجموعة PSTVd من الفيرويدات

The Domain Model For The PSTVd Group of Viroids

نتيجة فحص تماثل التتابع مع أكثر من ٤٠ تنوع تتابع، وهى توضع الآن تحت مجموعة PSTVd للفيرويدات. إن كلا من Keese & Symons سنة ١٩٨٥ قد وضحا بالتفصيل نموذج النطاق للفيرويدات والذى يكون أيضاً ملائماً للفيرويدات من تحت مجموعة B_2 و B_3 ويزود الأساس المبنى عليه تقسيم الثلاثة تحت قسم Subdivisions ضمن مجموعة PSTVd الكلية. وبالتالى فإن طراز النطاق مناسباً لجميع الفيرويدات لغاية الآن (المعروف تتابعها) باستثناء ASBVd.

عند دراسة المعلومات الموجودة فى جدول رقم ٨ فإنه من المهم أن نتذكر أن مقارنة التتابع فى PSTVd مع ٢٥ تتابع عشوائى من حيث الحجم وتركيب القاعدة بنفس الطريقة يعطى تماثل تابع بنسبة ٢٩,٥ ± ٤,٢ ٪. وبالتالى فإن أى تماثل فى التتابع الكلى يصل لـ ٢٥ ـ ٣٥ ٪ بين فيرويدين يمكن أن يؤخذ بعين الاعتبار ليدل على عدم العلاقة بينهما، فمثلاً بالنسبة لـ ASBVd بمقارنته مع جميع الفيرويدات الأخرى كما فى جدول ٨ يظهر عدم العلاقة بينه وبينها.

حتى بالنسبة للفيرويدات ضمن نفس تحت المجموعة Subgroup، فإن المقارنة يمكن أن تظهر إنخفاضاً فى تماثل التتابع الكلى. فى تحت مجموعة PSTVd هناك مقارنة ثمانية حالات فى حالة زوجية أظهرت التماثل والذى يتراوح ما بين ٤٢ ـ ٣٣ ٪. يجب أن نعرف أن تماثل التتابع الكلى يكون له قيمة محدودة فى تصنيف الفيرويدات ولا يعتمد عليه بشكل كامل، حيث أن كلاً من Koltunow & Rezaian سنة ١٩٨٩ ذكرا بعض الانتقادات للذين يعتمدون اعتماداً كلياً فى التصنيف على تماثل التتابع الكلى بين الفيرويدات.

جدول ٨: تماثل التتابع بين ازواج من الفيرويدات كما حددت باستعمال طريقة Wilbur & Lipman سنة ١٩٨٣.

	PSTVd	TPMVd	TASVd	CEVd	CSVd	CCCVd	CTiVd	HSVd	HLVd	GVd1B	GYSVd	ASSVd
TPMVd	77											
TASVd	96	73										
CEVd	60	65	77									
CSVd	66	68	72	63								
CCCVd	47	48	44	44	44							
CTiVd	43	45	43	46	37	64						
HSVd	44	41	36	47	33	44	40					
HLVd	44	45	47	40	37	50	49	42				
GVd 1B	42	49	42	40	37	34	34	34	38			
GYSVd	37	44	40	40	40	30	31	38	42	73		
ASSVd	42	36	40	40	44	31	38	36	30	46	42	
ASBVd	32	30	32	29	33	26	32	35	31	29	31	28

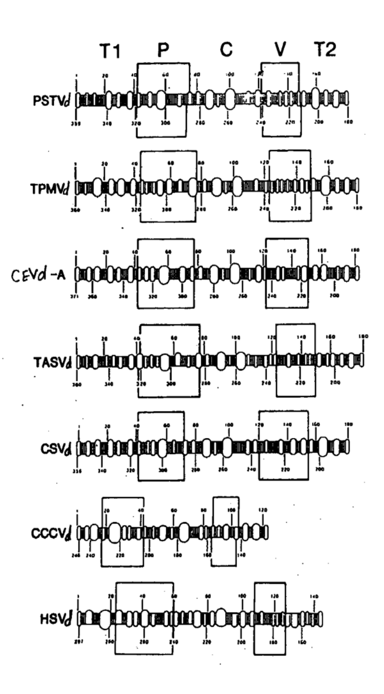
المقاسات التى استخدمت فى هذا الجدول: K = 4، W = 100، g = 4

نموذج النطاق لتحت مجموعة B_1 من PSTVd

The Domain Model For The PSTVd Subgroup B_1

إن مقارنة تحليل تتابـع الحالة المزدوجة لأفراد مـن تحت مجموعة B1 من PSTVd أظهرت وجود خمسة نطاقات (شكل ٧) وقد عرفت حدودها بواسطة ملاحظة تغييـرات حادة فى تماثـل التتابع من المرتفع إلى المنخفض والعكس بالعكس. هناك مقارنـات لحـالات ازدواجية مختلفة كانـت دائمـاً ثابتة فـى تحديد الموقع الدقيق (الصحيح) لحدود النطاقات. هنـاك شكـل توضيحى يشرح هذه الحدود فى سبعة فيرويـدات فى شكـل ٨. وبالتالـى فإن هـذه النطاقات كانت قد اكتشفـت بواسطـة مقارنة تماثل التتابع بـين قطـاعات من كل جـزئ للفيرويـد مفضلاً ذلـك على طريقـة تماثل التتابع الكلـى فى جـزئ الفيرويد.

هناك صفات أخرى لهذه النطاقات مكتوبة باختصار فى جدول ٩، ١٠. بالرغم من التنوع فى طول أفراد من فيرويدات تحت مجموعة PSTVd، إلا أن عدد النيوكليتيدات فى نطاق C ثابت بشكل واضح والاختلاف فقط فى مواقع ٩٥ ـ ٩٧ فى أفراد هذه المجموعة. بالنسبة لاصغر الفيرويدات فإن أكثر النقص فى الحجم يحدث فى النطاقين(T_1، V). إن تماثل التتابع بين النطاقات فى مختلف الفيرويدات (جدول ١٠) ذو درجة عالية من الأهمية، بسبب الإختلافات الملحوظة والتى يمكن أن تحدث بين النطاقات المتجاورة. كانت مثل هذه المقارنة هى التى أدت إلى الاقتراح بأن الفيرويدات نشأت (تطورت) عن طريقة إعادة ترتيب النطاقات بين مختلف أفراد الفيرويدات المهاجمة لنفس الخلية وما يتبع ذلك من طفرات ضمن كل نطاق.



شكل رقم ٨ :

• رسم يوضح النطاقات لسبعة فيرويدات فى تحت مجموعة PSTVd.

جدول ٩ : يبين حجم نطاقات الفيرويد

اسم الفيرويد	نطاق T_1	نطاق P	نطاق C	نطاق V	نطاق T_2	المجموع
PSTVd	٨٣	٦٣	٩٥	٥٤	٦٤	٣٥٩
TMPVd	٨٨	٦٣	٩٥	٥٢	٦٢	٣٦٠
TASVd	٨٢	٧٠	٩٧	٤٩	٦٢	٣٦٠
CEVd	٨٤	٦٩	٩٧	٥٧	٦٤	٣٧١
CSVd	٨٣	٦٠	٩٥	٦٦	٥٢	٣٥٦
CCCVd	٣٣	٤٩	٩٥	٢٨	٤١	٢٤٦
CTiVd	٣٢	٤٧	٩٥	٣٩	٤١	٢٥٤
HSVd	٤٥	٧١	٩٧	٣٧	٤٧	٢٩٧
ASSVd	٩٢	٥٦	٩٢	٢٩	٦١	٣٣٠
AGVd	١٠١	٥٠	١١٠	٣٦	٧٢	٣٦٩
GySVd	١١٣	٤٥	٩٧	٣١	٨١	٣٦٧
GVd 1B	١١٢	٥٠	٩٧	٢٩	٧٥	٣٦٣

ملاحظة :

إن الحدود بين نطاقى T1، P قد تغير قليلاً كما ذكر Keese & Symons سنة ١٩٨٥.

جدول ١٠ : تماثل التتابع بين النطاقات فى الفيرويدات المختلفة.

الفيرويدات المستعملة فى المقارنة المزدوجة		٪ تماثل التتابع فى النطاقات					
1	2	T_1	P	C	V	T_2	الكلى
PSTVd	CEVd - A	٧١	٦٤	٧٢	٤٩	٤٨	٦٠
	TPMVd	٧٠	٧٦	٩٨	٣٨	٩٤	٧٧
	TASVd	٧٢	٦٠	٧٢	٤١	٩٠	٦٩
	CSVd	٧٨	٤٧	٧٩	٤٥	٨٣	٦٦
	CCCvd	٢٦	٢٧	٧٥	٣٧	٣٥	٤٧
	CTiVd	٢٨	٣٦	٦٣	٢٨	٣٦	٤٣
	HSVd	٣٤	٦٤	٤٤	٣٥	٢٩	٤٤
CEVd - A	TPMVd ←	٧٤	٦٤	٧٢	٤٦	٤٨	٦٥
	TASVd	٩٣	٧٢	٩٩	٤٥	٥١	٧٧
	CSVd	٧١	٤٨	٨٤	٣٩	٣٨	٦٣
	CCCVd	٣١	٣٢	٦١	٣٥	٤٦	٤٤
	CTiVd	٣٨	٣٨	٦٧	٤٠	٣٨	٤٦
	HSVd	٤٢	٦٧	٤٥	٣٢	٣٤	٤٧
TPMVd	TASVd ←	٧٤	٥٧	٧٤	٣٨	٩٨	٧٣
	CSVd	٦٩	٥٢	٧٤	٥٩	٨٨	٦٨
TASVd	CSVd ←	٧٢	٥٦	٨٢	٥٢	٨٩	٧٢
CCCVd (246)	CTiVd ←	٦٨	٥٠	٦٦	٧٥	٥٩	٦٤
	HSVd	٦٤	٤٥	٤٣	٣٤	٤٣	٤٤
CTiVd	HSVd ←	٦٠	٣٩	٤٧	٣٢	٤١	٤٠

استعملت المقاسات K = 4 ، W = 4 ، g = 4

١ - نطاق C = C Domain:

هذا النطاق من أكثر النطاقات حفظاً Conserved، فى المقارنة الازدواجية بين الفيرويدات فإن تماثل التتابع يختلف بين ٤٤٪ و ٩٩٪، هذه القيم تكون مساوية لـ أو أكثر من تماثل التتابع الكلى (جدول ١٠). إن المميزات الأساسية لهذا النطاق هو وجود إنتفاخ لولبى (حلزونى) على نحو تام يسمى U - bulged كما فى شكل ٧ وتتابع متكرر مقلوب (الاسهم فى شكل ٧) والتى معاً تحدد ما يسمى بالمنطقة المركزية المحفوظة Central conserved region (CCR) ضمن مجال C. إن هذه المنطقة CCR هى التى تحدد تحت قسم subdivision لمجموعة PSTVd إلى ثلاثة تحت مجموعات.

٢ - نطاق P = P Domain:

تكون هذه المنطقة مترافقة مع التعبير بالأعراض المرضية، هذا ما قرره كثير من الباحثين. إن المميزة الأساسية لهذا النطاق هى قطعة من Adenine dominated Oligopurine بحوالى ١٥ ـ ٢٠ نيوكليتيدة على الشريط العلوى لجميع الفيرويدات باستثناء CCCVd حيث يوجد تتابع Oligo (As). أما على قاعدة نطاق P فإن Oligo (U_4 -7) غالباً ما تكون موجودة باستثناء مما هو فى CCCVd و CTiVd والتى تحتوى على قطعة غنية من Oligo (A) بسبعة نيوكليتيدات.

نطاق P فى فيرويد CEVd يلعب دوراً فى المرضية:

إن العزلات التى تحدث طبيعياً فى الفيرويد وتؤخذ من نبات مفرد، غالباً ما تحتوى أكثر من تنوع تتابع من الفيرويد، وهذا التنوع يمكن أن يفصل ويحدد تتابعه عن طريق تحضير كلونات cDNA الكامل الطول من مخلوط فيرويد. نظراً لأن كلونات cDNA للفيرويدات ونسخها من RNA والتى هى معدية عندما تحقن على نباتات قابلة للإصابة يمكن أن تحضر، هذا يقدم فرصة فريدة لعلاقة تتابع ومن ثم تركيب ذو مرضية.

إن تحليل تتابع تنوعات كل من PSTVd ، CEVd ، HSVd، أظهر أن جميع إختلافات التتابع (تقريباً) لكل فيرويد تقع ضمن نطاقى P و V. هذا يدل على أن التنوع فى شدة التعبير عن الأعراض المرضية فى تنوعات التتابع، يكون أكثر احتمالاً لأن يحدد عن طريق اختلاف التتابع فى واحد أو كلا هذين النطاقين. معظم المعلومات المتوفرة عن CEVd والنتائج تظهر أنه فى ١٧ من تنوعات التتابع، فإن جميع إختلافات التتابع تحدث ضمن نطاقى P و V فى مناطق تسمى PL و PR شكل ٩.

لتحديد أى من النطاقين P أو V كليهما كان مسئولاً عن تغيير التعبير المرضى. حضرت إصابة تجريبية بكلونات cDNA والتى فيها احدى نصفى تنوع تتابع كان قد إرتبط خلال نطاق C مع النصف الثانى من تنوع ثانى (شكل ١٠). استعمل إثنان من تنوعات التتابع احداهما من الذين يحثون على إحداث أعراض شديدة على بادرات الطماطم والآخر من الذين يحثون على إحداث أعراض شديدة البساطة (معتدلة جداً). كانت تركيبات cDNA ملائمة حضرت باستعمال مناطق ال Bam HI و Hind III فى نطاق C. أظهرت النتائج الحيوية بوضوح أن نطاق P يحدد تعبيرات العرض المرضى، بينما نطاق V يمكن أن يكون له تأثير على مستوى الفيرويد الذى يتكشف فى النباتات المصابة. ولقد تأكد أن تتابع الفيرويدات الجديدة (الذرية) كانت دائماً نفسها كما فى تلك المكلونة المستعملة فى الحقن.

نطاق V = V Domain :

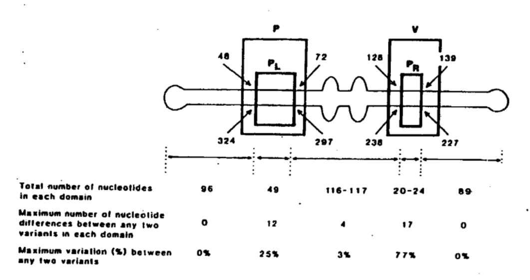
هذا النطاق يظهر الاختلافات الكبيرة فى التتابع بين الفيرويدات قريبة الصلة. يظهر هذا النطاق أقل من ٦٠٪ تماثل فى التتابع بين أى زوج من الفيرويدات باستثناء بين CCCVd و CTiVd (جدول ١٠) وهو أيضاً الأصغر حجماً يختلف من ٢٨ ـ ٦٦ نيوكليتيدة (جدول ٩).

إن العلاقة الوحيدة المعنوية فى التتابع فى هذا النطاق بين فيرويدات تحت المجموعة B_1. تكون منطقة Oligo - purine: Oligopyrimidine عادة فى أقل الحالات ثلاثة أزواج قواعد G: C. فى حالة الفيرويد CEVd فإن نطاق V قد يكون له دوراً فى تحديد المستوى من CEVd فى نباتات الطماطم المصابة. هناك أيضاً تنوع كبير فى التتابع فى هذا النطاق بين تنوعات التتابع للفيرويد CEVd.

نطاقات T T Domains:

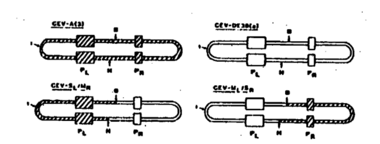
إن النطاقين الطرفيين لهما أهمية كبيرة وذلك بسبب الأدوار التى يمكن أن تقوم بها فى تناسخ الفيرويد وفى التكشف التطورى لجميع الفيرويدات فى مجموعة PSTVd. فمثلاً فإن هذه النطاقات يعتقد بأنها واقعة فى جزئ ال RNA المتبادل بين إثنين أو أكثر من الفيرويدات المهاجمة لنفس الخلية لتكون باعثة على فيرويدات جديدة متوقعة. مع أن الأدوار الوظيفية لهذه النطاقات غير واضحة تماماً، إلا أن المحافظة العالية للتتابع فى تتابعات تنوعات نفس الفيرويد يدل على الدور الهام فى التضاعف (التناسخ). إن نطاق T_2 فى الفيرويد CCCVd يكون غير مألوف فى ذلك الاختلاف فى التتابع الجزئى الناشئ خلال تكشف مرض كادانج ـ كادانج فى نخيل جوز الهند.

إن تماثل التتابع فى نطاقات T فى تحت مجموعة B_1 للفيرويد PSTVd يظهر تتابع محفوظ بشكل تام لـ C - C - U - C فى نهاية العروة لنطاق T_1 ولتتابع مجموعات C - C - U- U - C فى نطاق T_2 شكل ٧. هذه الحوافز تكون أيضاً موجودة فى التتابعات الحديثة لكل من CLVd وHLVd. وعلى أية حال فإن هذه الحوافز لا تكون محفوظة فى فيرويدات ASSVd وتحت مجموعة B_2 أو فيرويدات CbVd تحت مجموعة B_3 مع استثناء المواقع الصحيحة لـ C - C - U - C - C فى النهاية اليسارية للنطاق T_1 فى GVd 1B.



شكل رقم ٩ :

ملخص لتحليل التتابع لسبعة عشر تنوع تتابع من فيرويدات اكسوكورتز الحمضيات. يحدث معظم تغيرات النيوكليتيدات فى نطاقى P_L و P_R ضمن نطاق المرضية العادى P ونطاقات V المتغيرة.



شكل رقم ١٠ :

رسم توضيحى لأبوين من فيرويدات اكسوكورتز الحمضيات وفيرويدين من وحى الخيال. الاب CEVd - A (2) يسبب أعراض شديدة على بادرات الطماطم، بينما الاب الثانى CEVd- DE 30 (a) يسبب أعراض معتدلة. P_L، P_R تدل على النطاقات المعروفة. B تدل على موقع Bam HI أما H فتدل على موقع Hind III فى كلونات cDNA. هذه المعلومات استعملت فى بناء الفيرويدين الاخرين.

النطاقات فى ال ASSVd تحت مجموعة B_2 من الفيرويدات:

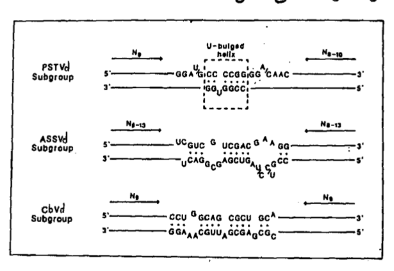
يمكن تقسيم كل فيرويد من الثمانية فيرويدات التابعة لتحت مجموعة ASSVd إلى خمسة نطاقات بواسطة المقارنة بالتتابع الزوجى بنفس الطريقة المتبعة فى تحت مجموعة PSTVd. إن الصفة الأساسية المشتركة بينهم هى وجود منطقة محفوظة مركزية ضمن نطاق C والتى تكون محدودة على قمة الشريط بواسطة تكرار طرفى، ولكنها هى التى تظهر نيوكليتيدات مختلفة على ال CCR من فيرويدات تحت مجموعة PSTVd. أيضاً ففى وسط نطاق T_1 فإن هناك مجموعة (تكتل) من ٢٠ نيوكليتيدة محفوظة بشدة موجودة فى كلا الخيطين.

نطاق C فى مجموعة PSTVd من الفيرويدات:

ضمن نطاق C فى أفراد تحت مجموعة B_1 من فيرويدات PSTVd وتحت مجموعة B_2 فى فيرويدات ASSVd، فإن هناك منطقة مركزية محفوظة محددة جيداً تسمى Central conserved region (CCR) والتى لها مميزات عامة مشتركة بين التحت مجموعتين حتى برغم عدم وجود تتابع مشترك. كذلك فإن الصفات المشتركة تكون موجودة فى الفرد الوحيد من تحت مجموعة B_3 من فيرويد CbVd. وبناءً على هذه القواعد فإن جميع تتابعات الفيرويدات (لغاية سنة ١٩٩١) باستثناء ASBVd يمكن تصنيفها ضمن مجموعة PSTVd وتقسم إلى ثلاثة تحت مجموعات. بالإضافة لذلك فإن علاقات ارتباط زيادة عن ذلك تكون موجودة بين أفراد من تحت مجموعة PSTVd و ASSVd قد تم اظهارها عن طريق وجود خمسة نطاقات متتابعة فى هذه الفيرويدات. يمكن التنبوء بتركيب خمسة نطاقات مشابهة لتحت مجموعة CbVd كفيرويدات جديدة مكتشفة تتابعاتها تحدد على تحت المجموعة هذه.

إن المميزات العامة لمنطقة CCR فى التحت ثلاثة مجموعات موضحة فى شكل ١١. إن حدود منطقة CCR تكون واضحة ومحددة بواسطة تتابع متكرر مقلوب

فى قمة الشريط والتى يمكن أن تزود بساق دبوس الشعر والذى لا يكون دائماً ثنائى القاعدة تماماً. إن طول كل ساق يختلف من ٨ - ١٣ نيوكليتيدة، مع أنه بشكل أكثر شيوعاً يكون بطول ٩ نيوكليتيدات خاصة فى تحت مجموعة PSTVd يكون طول الشريط العلوى عادة ٣٢ نيوكليتيدة بالنسبة لتحت مجموعة PSTVd، إلا أنه يختلف من ٣٢ - ٤٢ نيوكليتيدة لتحت مجموعة ASSVd، ويكون ٣٤ نيوكليتيدة مقصوراً على أفراد تحت مجموعة CbVd. هناك نيوكليتيدات مفردة أو استثنائية محفوظة على كلا الشريطين فى منتصف كل من CCR وهذه واضحة فى شكل ١١.

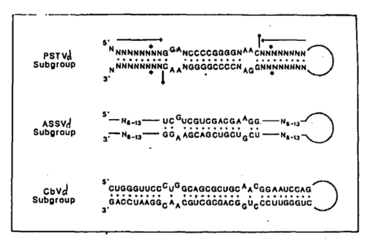


شكل رقم ١١:

المنطقة المحفوظة المركزية CCR لثلاثة من تحت مجموعة PSTVd تحدد هذه المنطقة بنهايات التتابع المتكرر المقلوب. ويهظر طول كل واحدة منها.

إن الانتفاخ اللولبيى (الحلزونى) الذى على شكل حرف U يكون ذو أهمية خاصة فى فيرويدات تحت مجموعة PSTVd. إنه يظهر تركيب متجانس مع رايبوسومال L 18 على منطقة الارتباط فى 5S RNA فى البكتيريا E. cloi ومع المنطقة اللولبية المنتفخة المركزية المحفوظة على 5S RNAs للنباتات الراقية. ومن المحتمل أن بروتينات العائل المرتبطة لهذه المنطقة يمكن أن تلعب دوراً فى تناسخ هذه المجموعة من الفيرويدات.

إن التتابع المتكرر المقلوب فى الشريط العلوى لمنطقة CCR لفيرويدات مجموعة PSTVd يسمح بتكوين تركيبات غالباً ثنائية الخيط ذات رأسين (تركيبها من الامام يشبهه من الخلف) فى أزواج Dimeric أو تكرارات أطول قليلة الأزواج Oligomeric من هذه الفيرويدات شكل ١٢. هناك اعتقاداً هاماً بأن هذه التركيبات يمكن أن تلعب دوراً فى بناء البوادئ قليلة الازدواج الناتجة خلال تناسخ الدائرة الملتفة ليعطى خيط آحادى الأزواج و / أو جزيئات دائرية فى المعمل وبالتالى تجهز الخطوة الأخيرة فى عملية التناسخ. وعلى كل حال فإن الدليل يكون عادة غير مباشر فى التجارب العادية، بينما فى التجارب المعملية لم تزود بدليل واضح لنتيجة العمليات الخاصة. أحياناً فإن البيانات الواضحة للخيط العلوى فى منطقة CCR يبدو أنها داخلة فى سلسلة العمليات فى الظروف الطبيعية كانت قد زودت من دراسات الحيوية مستعملة نسخاً من CEVd محتوية طفرات آحادية القاعدة فى الشريط العلوى فى منطقة الحلزون المنتفخ على شكل حرف U فى شكل ١١.



شكل رقم ١٢:

تركيب متعاكس الذى من الممكن أن يكون فى ترادفات monomeric متكررة من أفراد كل تحت مجموعة من مجموعة PSTVd. جميع التتابعات مأخوذة من الخيط العلوى من CCR. موقع التكرار المنقلب فى الثلاثة تحت مجموعات يشار عليه بالأسهم. أما حرف N فهى نيوكليتيدات غير محفوظة. فى فيرويد HSVd فإن U مغروزة فى موقع معلم بالدائرة المطموسة فى تحت مجموعة PSTVd، علامة النجمة تدل لمواقع غرز لاثنين غير مزودجين من النيوكليتيدات فى فيرويد HLVd.

الدور المقترح فى إعادة تنظيم النطاقات فى نشوء الفيرويدات

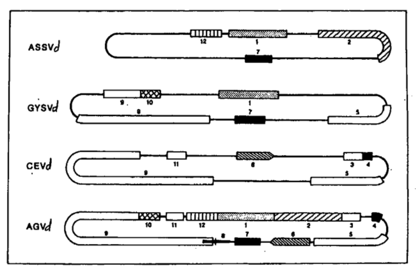
Proposed Role of Rearrangement of Domains In The Evolution of Viroids

إن نموذج النطاق بمجرد وصفه يؤدى إلى الاقتراح بأن نشوء الفيرويدات يتضمن إعادة ترتيب النطاقات بين إثنين أو أكثر من الفيرويدات والتى تهاجم نفس الخلية متبوعاً بواسطة طفرات أخرى. يكون دائماً هناك شئ من الصعوبة للتزويد بأدلة مباشرة لمثل هذه الاقتراحات، ولكن بسبب ظهور تتابعات لفيرويد جديد فإن أدلة قوية غير مباشرة تكون واضحة وتؤكد الاقتراح. والمثل الجيد على ذلك هو التتابع الحديث لفيرويد CLVd والذى فيه نطاقات T_1 وT_2 تظهر تماثل عال فى التتابع لنفس النطاقات فى PSTVd و TASVd بالترتيب، وتكون الحدود محددة جيداً بواسطة المقارنة بالطريقة الزوجية بين أعداد من تحت مجموعة PSTVd (شكل ١٠). إن وجود أطوال تحت نطاقية Sub - domain lengths فى تتابعات TPMVd فى نطاق P، وفى تتابعات PSTVd و HSVd فى نطاق C يدل على أن إعادة ترتيب RNA يمكن أن تحدث ضمن النطاق بالإضافة إلى منطقة الحدود (شكل ١٠).

إن مقارنة تحليل التتابع لـ AGVd فى تحت مجموعة ASSVd قد أظهر أيضاً خليط متزاحم من قطع والتى تبدو وكأنها مأخوذة من CEVd ، PSTVd، ASSVd و GYSVd شكل ١٣ . هذه القطع لها تماثل فى التتابع والذى يختلف من ٥٢ – ١٠٠ ٪ من التتابع المتطابق فى فيرويدات الآباء المفترضة. لهذا فإن هذا الفيرويد يكون مثلاً آخر والذى فيه يظهر إعادة الترتيب للحمض النووى RNA والتى يمكن أن تحدث ضمن النطاقات. إنه المثل الأول والذى يظهر فيه مثل إعادة الترتيب هذه والتى يجب أن تأخذ مجراها بين الفيرويدات ضمن تحت مجموعتين من الفيرويد منفصلتين.

الدليل المباشر على إعادة الاتحاد فى RNA بين ال RNAs الفيرويدية:

إن إعادة الاتحاد المفترض فى RNA فى النطاقات وتحت النطاقات بين الفيرويدات مشتركة الإصابة (كما قد بينا) مبنياً على مقارنة تحليل التتابع. مع أن جميع الأدلة تكون مؤيدة لإعادة الاتحاد فى RNA، إلا أنه لا يوجد بيانات تدل على الفترة الزمنية التى تلزم لمثل إعادة الاتحاد هذه لكى تحدث بين الفيرويدات مشتركة الإصابة، كذلك لا يوجد أية محاولات ذكرت عن إنتاج فيرويدات خيالية (وهمية) بواسطة الحقن المشترك لفيرويدين بينهما علاقة على عائل نباتى مشترك. إن مثل هذه التجارب أصبحت الآن معقولة بواسطة استعمال سلسلة تفاعل ال Polymerase والاختيار الدقيق المحكم للبـوادئ (سلسلة قصيرة من DNA) والتى يمكن أن تسمح بالتعرف على الجزيئات الناتجة المتوقعة. إن مثل هذا الاقتراح يمكن أن يكون أساسياً نظراً لأن أى من الذرية المتوقعة قد تكون ذات أضرار فى التناسخ عندما تقارن مع الأبوين وبالتالى يمكن أن تتواجد فقد بتركيزات منخفضة.



شكل رقم ١٣:

علاقات التتابع بين فيرويد AGVd وثلاثة فيرويدات أخرى، القطع ذات تماثل التتابع العال بين فيرويدين أو أكثر محفوظة فى علب ومرقمة.

إن الأحماض النووية RNAs الفيروسية تكون وسيلة مزودة بأدلة أكثر ثباتاً عن إعادة الاتحاد فى RNA. إن أكثر الأمثلة توضيحاً لذلك هو العمل الذى قام به Allison et al سنة ١٩٩٠ والذى إقترح بأن إعادة التكاثر لجينوم RNA الفعال بواسطة إعادة التكاثر بين نواتج الطفرات المقتضبة Deletion mutants. فى هذا البحث فإن فيرس التبرقش الشاحب فى اللوبيا Cowpea chlorotic mottle Virus (CCMV) كان يستعمل فى هذه الدراسة نظراً لأنه يحتوى على جينوم ثلاثى فى ثلاثة أحماض RNAs أحادية الشريط. إن الحقن المشترك لهؤلاء الثلاثة جميعاً يبدو أنه يكون مطلوباً لمقدرته (حيويته) على أوراق اللوبيا. إن الأحماض النووية الكبيرة من RNA وهما RNA_1 وRNA_2 تكون أحادية السسترونك monocistronic أما RNA_3 فإنه ثنائى السسترونك discistronic ويعمل شفرة لبروتينات 3a وللغلاف البروتينى. إن DNA المكلون عن كل من هذه الأحماض الثلاثة حضرت بحيث زودت RNA transcripts لدراسة الحيوية. إن الالغاء الذى يتم ضمن أى من الجين 3a أو جين الغطاء البروتينى يبطل حيوية الفيرس. وعلى أية حال فإن الحقن المشترك للأحماض RNA_1، RNA_2 كل منهما مع RNA_3 يبطل الطفرات التى تؤدى إلى إنتاج ذرارى فيرس تحتوى النوع الأصلى RNA_3 وهذا ثبت بطريقة تحليل التتابع. ونظراً لأن إعادة الاتحاد فى RNA قد حدثت بين الناتجات من طفرة $RNAs_3$ ومستويات عالية من الفيرس قد حصل عليها فى اليوم السابع أو بضع أيام بعد الحقن.

لقد ذكر العالم Robert H. Symons فى مقالة المنشور فى مجلةMolecular Plant - Microbe Interaction عدد ٤ صفحة ١١١ ـ ١٢١ الصادر فى سنة ١٩٩١ تحت عنوان دورية التتابع فى الفيرويدات تدل على أن النشوء يتم بواسطة التضاعف كما يلى:ـ

Periodiciy of Sequences in Viroids indicates Origin by duplication.

تبدى معظم الفيرويدات تركيبات دورية (تركيب معين يتكرر بالترتيب) يتميز بتكرار وحدات من ١١ أو ١٢ نيوكليتيدة فى تحت مجموعة PSTVd، و ٦٠ نيوكليتيدة فى ASSVd و ٨٠ نيوكليتيدة فى ASBVd. مع أن التتابع المتكرر وجد فقط فى حوالى $\frac{1}{3}$ من مجموع التتابع فى أفراد تحت مجموعة PSTVd، فإن أطول المتكررات فى ASSVd و ASBVd تشغل الطول الكامل فى كل جزئ.

إن الدوريات فى جدول ١١ يبدو أنها متخصصة فى الفيرويدات، نظراً لعدم وجودها فى RNAs الصغيرة الأخرى أو الفيروسايدات. وعلى أية حال فإن الدورية الواضحة لم توجد فى HSVd أو فى تنوعات التتابع الخاصة بها فى فيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار، ولا فى أفراد كلتا تحت مجموعة PSTVd وهذا الشئ يبقى محيراً. ولقد إقترح بعض العلماء أن الدورية الملاحظة فى الفيرويدات يمكن أن تلعب دوراً فى تفاعل RNA الفيرويدى الشبيه بال DNA مع البروتينات نظراً لأن واحدة من صفات DNA هى المقدرة على ربط البروتين لتكون دورية تركيبية.

هناك إحتمالية أخرى هى ذلك التركيب الدورى لمعظم الفيرويدات يعكس أصلها التطورى حيث تضاعف التتابع يكون متبوعاً بطفرة تسمح بزيادة فى حجم وتكشف جزيئات الإصابة. المثل الممتاز لهذا التضاعف الجزئى لجزئ الفيرويد يظهر خلال الإصابة لنخيل جوز الهند بواسطة فيرويد CCCVd. إن الفيرويد المتكون من ٢٤٦ نيوكليتيدة تظهر مبكرة فى الإصابة، لكن كلما تكشفت الأعراض تنشأ أشكالاً ذات وزن جزيئى أكبر جديدة، وفى آخر الأمر تسيطر على تجمعات الفيرويد كلما تقدم المرض. يحدث تضاعف لجيمع نطاق T_2 ويبدأ على ثلاثة مواقع منفصلة ضمن نطاق V ليعطى تتابعات زيادة من ٤١، ٥٠، ٥٥ أو ٢ × ٥٠ نيوكليتيدة.

المضمون الوظيفى لتكشف هذه الأشكال الأعلى من CCCVd خلال تقدم المرض لم تعرف بعد. هنا بعض الفوائد تؤخذ من التضاعف، فمثلاً زيادة التنافس لربط هذه التتابعات المتكررة لبعض مكونات العائل ضرورياً للتضاعف ولكن هذا يكون بصفة محدودة.

لقد ذكر أن التضاعف لنطاق T_2 من CCCVd يحدث بواسطة إنقطاع النسخ بأنزيم RNA polymerase ملتفاً أو قافزاً من قالب إلى آخر. هناك نموذجاً مماثلاً لتلك المقترح فى فيرس الانفلونزا. فرضاً فإن تضاعف التتابع فى الأفراد الأخرى من فيرويدات مجموعة PSTVd يمكن أن تحدث بطريقة متماثلة للمرحلة الأخيرة لبناء جزئ كامل الطول.

جدول ١١ : أمثلة على الدورية التركيبية فى الفيرويدات.

الفيرويد	وحدات متكررة نيوكليتيدة	الاجماع
PSTVd	١٢	CNGRRGRRAYCN نيوكليتيدة ٦٩ – ١٧٢
CCCVd	١٢	CNGRRGRRAYCN نيوكليتيدة من ٢٤٤ ـ ١٢٩
ASSVd	٦٠	متكررة ٤,٥ ـ ٥,٥ مرة فى ٣٣٠ نيوكليتيدة
ASBVd	٨٠	متكررة ٣ مرات فى ٢٤٧ نيوكليتيدة

ملاحظات :

N = a non con served nucleotide A, C, G, or U , Y = Pyrimidene , R = Purine.

تتابع النطاقات فى الفيرويدات والفيروسايدات يدل على النشوء بواسطة أعادت ترتيب RNA .

Sequence Domain In Viroids and Virusoids indicate Evolution by RNA Rearrangement.

بمقارنة تحليل تتابع الأزواج لأفراد تحت مجموعة B_1 من PSTVd دلت على وجود خمسة نطاقات والتى تعينت حدودها عن طريق التغيرات الحادة فى تماثل التتابع من العالى إلى المنخفض والعكس بالعكس. المقارنات الزوجية المختلفة كانت دائماً متناسقة مع الموقع الصحيح مع الحدود لكل نطاق. لقد تبين نموذج النطاقات باستعمال التتابع فى الفيرويد فقط من تحت مجموعة B_1 لمجموعة PSTVd. وعلى أية حال فإن فيرويدات مرض ندب الجلد فى التفاح ASSVd تحت مجموعة B_2 لها نفس النطاقات كما يظهر بواسطة مقارنة الأزواج فى التتابع.

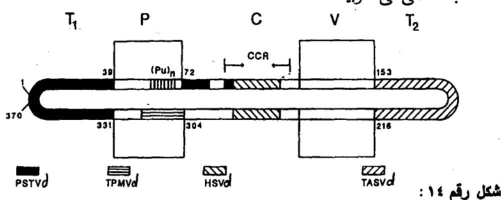
تقسم مجموعة PSTVd إلى تحت مجموعتين على أساس التتابع فى المنطقة المركزية المحفوظة لنطاق C. ضمن نطاق C فى كل تحت مجموعة هناك تتابعات حوالى ٣٠ نيوكليتيدة والتى هى محفوظة تماما highly conserved بين كل الأفراد لكل تحت مجموعة ولكنها تختلف تماماً عن تلك الموجودة فى تحت المجموعات الأخرى. تتابعات المنطقة المركزية المحفوظة هذه تشكل ثلث نطاق C فى كل حالة. وعلى أية حال فإن المميزة العامة لكلا تحت المجموعتين هو وجود تتابع متكرر مقلوب قصير Short inverted repeat sequence ضمن النيوكليتيدات المحفوظة والتى تظهر على شكل أسهم فى شكل ٧.

هذا النموذج للنطاق يؤدى إلى الافتراض بأن نشوء الفيرويدات داخلاً فى إعادة الترتيب للنطاقات بين الفيرويدات المهاجمة لنفس الخلية متبوعاً بنشوءات أخرى. إن الإثبات التجريبى لهذا الافتراض صعب تحقيقه ولكن التتابعات للفيرويد الجديد والتى تستمر فى الظهور أعطت إثبات قوى غير مباشر. فمثلاً فى تتابع Columnea latent viroid ، فإن نطاقات نهاية اليد اليسرى T_1 ونهاية اليد اليمنى T_2 تظهر تجانس

تتابع مرتفع لنفس النطاقات فى PSTVd فى فيرويد تقزم قمة الطماطم مع حدود محددة جيداً ومتناسقة مع مقارنات الأزواج الأخرى شكل ١٤. إن وجود أطوال لتحت نطاق من تتابعات فى فيرويد النبات الذكر فى الطماطم TPMVd فى النطاق الممرض P وفى PSTVd، HSVd فى نطاق C شكل ١٤، يدل على إعادة الترتيب التى يمكن أن تحدث ضمن النطاق بالإضافة إلى الحدود. أيضاً كذلك فإن الفيرويد المتسلق Scrambled وهو فيرويد العنب الاسترالى AGVd من ASSVd تحت مجموعة B_2 الذى فيه تقريباً جميع ال ٣٧٠ نيوكليتيدة يبدو وأنها مأخوذة من أجزاء من فيرويدات CEVd ، PSTVd، ASSVd وGySVd. إن تشابه التتابع فى أجزاء من AGVd يختلف من ٥٢ ـ ١٠٠٪ من التتابعات المتشابهة فى الفيرويدات الآباء المفترضة.

إن الميكانيكية التى يتم بها إعادة الترتيب للحمض RNA غير معروفة. إحدى الميكانيكيات المحتملة هى عدم استمرارية النسخ حيث أن RNA polymerase الذى ينسخ قالباً من فيرويد واحد أو فيروسايد يتحول إلى نسخ قالب ثانوى متجاور على بعض المواقع والأكثر احتمالية تحديدها بواسطة التركيب الثالث tetiary للقالبين.

من الأمثلة على إعادة الاتحاد بين الشريط الموجب لـ RNA للفيروسات هى التجمعات. فى حالة فيروسات النبات فإنه فى بعض الأحيان فإن المثال الأكثر تحديداً هو الذى ذكر بواسطة Allison et al سنة ١٩٩٠ عن فيرس التبرقش الشاحب الثلاثى فى اللوبيا.



شكل رقم ١٤:

رسم توضيحى للفيرويد CLVd يظهر القطع عالية تماثل التتابع مع فيرويدات أخرى. CCR منطقة مركزية عالية الحفظ.

ثالثاً: ـ إختلاف التتابع فى تنوعات التتابع فى الفيرويدات:

Sequence Variability in Sequence Variants of Viroids

مقدمة:

قبل أن ندخل فى هذا الموضوع يجب أن يكون لدينا فهماً واضحاً للاصطلاحات المستعملة والتى نذكر تعريفها فيما يلى: ـ

١ ـ **عزلة الفيرويد A Viroid Isolation**: هى مجموع جزيئات الفيرويد الكاملة الموجودة فى نبات مصاب واحد. إن مثل هذه العزلة يمكن أن تحتوى نوعاً واحداً أو أكثر من الفيرويد وتحتوى واحداً أو أكثر من تنوعات التتابع لكل أنواع الفيرويد.

٢ ـ **أنواع الفيرويد A Viroid Species**: تتكون أنواع الفيرويد من واحد أو أكثر من تنوعات التتابع مستقلة التناسخ والتى تظهر أكثر من ٩٠ ٪ من تماثل التتابع بواسطة المقارنة المزدوجة. جميع أفراد النوع الواحد تمتلك أقل من ٨٠ ٪ من تماثل التتابع مع أفراد من أنواع فيرويد آخر.

٣ ـ **تنوع التتابع A Sequence Variant**: هو جزئ فيرويد مفرد ذو تتابع محدد. وبالتالى فإن أنواع الفيرويد تحتوى واحداً أو أكثر من تنوع التتابع تحدث طبيعياً والذى كل منها يختلف بواحدة أو أكثر من النيوكليتيدات عن تنوعات التتابع الأخرى ولكن كلها تظهر أكثر من ٩٠ ٪ من تجانس التتابع بواسطة المقارنة الزوجية.

٤ ـ **النسبة المئوية لتماثل التتابع Percent Sequence homology**: يستعمل هذا الاصطلاح للمقارنة بين فيرويدين وهذا يحدد بواسطة طرق معتمدة على الكومبيوتر التى ذكرها Wilbur & Lipman سنة ١٩٨٣ وتستعمل فيها القياسات، K، W، g حيث أن $K = 4$ وهذا يستعمل للمقارنة فى الطول حيث المقارنة تساوى K أو أكثر.

W = 100 (Windo size) حجم الشق.

gap penalty g = 4 .

فى هذه التعريفات نفترض وجود أنواع الفيرويد منفصلة عن بعضها تماماً وليست إختلافات مستمرة فى التتابع فى الفيرويدات تحدث طبيعياً. مع أن هذا الأخير يعتبر غير محتمل فنحن نحتاج إلى وصف أنواع كثيرة من الفيرويدات وإلى عديد من تنوعات التتابع فى كل نوع قبل أن تستطيع أن نكون واثقين عند التمييز الواضح بين أنواع الفيرويد.

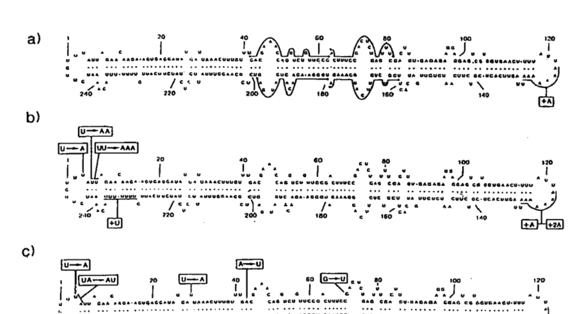
إن أكثر تنوعات التتابع دراسة وتمييزاً فى صفاتها هى تلك التابعة لكل من HSVd و ASBVd و CEVd وإلى حد ما PSTVd و CCCVd وهناك توضيح كامل ومطول عن تنوعات التتابع مذكورة فى كتاب Keese et al سنة ١٩٨٨ .

I - تنوعات التتابع فى ASBVd :

Sequence Variants of ASBVd

كان أول تحليل واضح لتنوعات التتابع فى ASBVd قام به Rakowski & Sy-mons سنة ١٩٨٩ . لقد حددا تتابعات ١٦ تنوع من ٢٤٧ نيوكليتيدة ذات علاقة مع ASBVd مثل تنوع SB - 1 والتى كانت قد عزلت من أوراق ثلاثة أشجار أفوكادو فى مناطق منعزلة فى استراليا. كانت معظم النيوكليتيدات المختلفة موجدة فى اليد اليمنى واليسرى للعروات فى جزئ ASBVd بينما العدد الباقى يختلف من ٢٤٦ إلى ٢٥١ نيوكليتيدة.

يظهر فى شكل ١٥ مواقع هذه التغيرات



شكل رقم ١٥ :

الاختلافات فى تنوعات التتابع المأخوذة من ثلاثة عزلات (a) ،(b) و(c) من فيرويد ASBVd. النيوكليتيدة المتغيرة موضوعة فى علبه وهى ذات علاقة بالتتابع وتقترح التركيب الثانوى فى تنوعات التتابع SB - 1 من الفيرويد ASBVd الموجودة فى عزلة (a). فى عزلة a فإن الأربعة مواقع من الطبقة الأولى فى مركز الجزئ الذى كان يستعمل لتوالد كلونات cDNA للتتابع تكون معلمة بخط.

II - تنوعات التتابع فى مجموعة PSTVd:

Sequence Variants of PSTVd Group of Viroids

١ : تنوعات التتابع فى CEVd

لقد أجرى معظم هذا البحث على خمسة عزلات استرالية مستخلصة من حمضيات ثم بعد ذلك تكاثرت فى الأقحوان والطماطم، وكان من المثير للاهتمام أنه على بادرات الطماطم فقد أعطت هذه العزلات الخمسة نوعين من الأعراض

فقط ١ ـ معتدلة أو صعبة الظهور. ٢ ـ شديدة حيث ظهر تدلى للأوراق شديد مع أوراق متجعدة وتقزم. كانت هذه العزلات كما يلى: ـ

١ ـ العزلات المسببة لأعراض شديدة هى CEVd - A، CEVd - DE 25، CEVd - J.

٢ ـ العزلات المسببة لأعراض معتدلة CEVd - DE 26، CEVd - DE 30.

إن مقارنة التنوعات المتتابعة مع كل عزلة يتطلب تحضير الطول الكامل لكلونات cDNA والتحديد الكامل لتتابعها. فقط فى هذه الطريقة يمكن لاختلاف التتابع ضمن تنوعات التتابع بالإضافة إلى تقدير عدد تنوعات التتابع فى كل عزلة يمكن تحديده. وعلى أية حال فإنه من المهم أن ندرك أن التتابع فى عدد كبير من كلونات cDNA يكون مطلوباً لاكتشاف عدد قليل من تنوعات التتابع. مثلاً إذا كان فرد معين من تنوع متتابع موجوداً بمستوى ٥ ٪ من مجموع التنوعات عندئذ على الأقل يجب أن يكون هناك ٢٠ كلونة من cDNA معروفة التتابع لتزويدنا باحتمالية معقولة لاكتشاف هذا الفرد. زيادة على ذلك فإن الكمية النسبية لكل تنوع تتابع فى أى عزلة يكون محتمل جداً لأن يتغير معتمداً على ظروف النمو وبشكل خاص أكثر على العائل النباتى المستعمل. وبالتالى فإن أعداد تنوعات التتابع فى أى عزلة واحدة حددت بواسطة تتابعات كلونات cDNA بالتأكيد سوف يكون تقديراً غير سليم.

وبالنسبة للعزلات السابقة فإن عزلة CEVd - A تحتوى على الأقل إثنين من تنوعات التتابع والتى تختلف بواسطة قليل من النيوكليتيدات، بينما CEVd - DE 25 وعزلة CEVd - DE 26 يبدو أنها تحتوى على تنوع متتابع واحد فقط. أما تنوعات التتابع فى عزلة CEVd - A وعزلة CEVd - DE 25 فإنها كانت متشابهة جداً مع التنوع المتتابع المسمى Californian والتى تحددت بواسطة Gross et al سنة ١٩٨٢. أما التنوع المتتابع فى CEVd - DE 26 فإنه يحتوى ٢٧ نيوكليتيدة تختلف نسبياً مع التنوع المتتابع فى CEVd - A. أما فى عزلة CEVd - J يظهر أكبر إختلاط

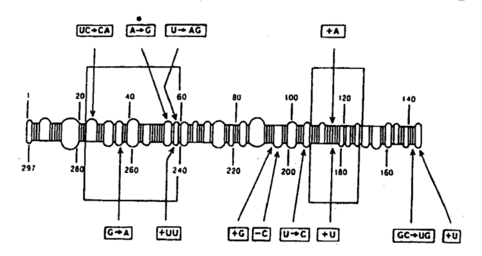
من تنوعات التتابع، فقد وجد أنه من تتابع حوالى ٢٠ كلونة من cDNA فقد وجد تسعة تنوعات متتابعة مختلفة. وهناك تجارب أخرى تدل نتائجها على وجود عدد كبير من تنوعات التتابع أكثر من تسعة فى حقل واحد مزروع بأشجار البرتقال المطعمة على أصول **Poncirus trifoliata** والتى تظهر عليها الأعراض الكلاسيكية لمرض اكسوكورتز الحمضيات، مثل إنفصال القلف عن جذع الأصل. بعد ذلك فإن أشجار الحقل يمكن أن تختلف بشكل كبير فى عدد التنوعات المتتابعة لـ CEVd الموجودة فيها.

إن إختلافات التتابع الموجودة فى ١٥ تنوع من CEVd الاسترالى بالإضافة إلى إثنين من تنوعات التتابع فى كاليفورنيا كانت واقعة بشكل أكثر وضوحاً فى نطاقى P و V (شكل ٩)، وبشكل أساسى فإن جميع التنوعات المتتابعة تكون زيادة على ذلك منحصرة فى مناطق أصغر والتى نطلق عليها p_L وp_R. إن منطقة p_R تتكون من ٢٠ ـ ٢٤ نيوكليتيدة من المجموع الكلى ٣٧٠ ـ ٣٧٥ نيوكليتيدة (٦٪ من جزئ CEVd) يكون قابل للتغير جداً مع كثير من تغير النيوكليتيدات، بينما منطقة p_L تتكون من ٤٩ نيوكليتيدة تحتوى قليل من التغيرات.

٢ ـ تنوعات التتابع فى HSVd :

إن فيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار CPFVd وفيرويد تقزم حشيشة الدينار HSVd تعتبر أصلاً كأنواع فيرويد منفصلة عندما حددت التتابعات النيوكليتيدة فيها لأول مرة فوجد أن طول الأول ٣٠٣ وطول الثانى ٢٩٧ . وعلى أية حال فإنهما تنوعات تتابع حقيقية لنفس الفيرويد بسبب أنها تمتلك أكثر من ٩٠٪ تتابع متماثل وعن طريق الاستعمال الشائع فقط يعتبر الفيرويد HSVd هو الاسم المستعمل للفيرويد وكأنه فيرويد منفصل. تنوعات التتابع بين التنوعات الأصلية لـ HSVd و CPFVd مذكورة فى شكل ١٦، وهى تقع غالباً فى نطاقى P ، V. وفى دراسات حديثة فإن Shikata سنة ١٩٩٠ لخص التوزيع والعلاقة بين تنوعات التتابع لـ HSVd المعزولة من مدى واسع لأنواع أشجار الفاكهة، وبالنسبة لعزلة حشيشة الدينار من HSVd،

فإن هناك سبعة تنوعات تتابع أخرى تختلف فى الطول من ٢٩٧ ـ ٣٠٣ نيوكليتيدة تصل إلى ١٣ متبادل، منها سبعة insertions داخلات وثلاثة deletions مشطوبات. وبالتالى فإن HSVd يكون مماثل لـ CEVd فى إظهار مجال من تنوعات التتابع فى العزلات الحقلية للفيرويد ومع معظم الاختلافات الحادثة فى نطاقى P و V.



شكل رقم ١٦ :

رسم توضيحى للنيوكليتيدات الواجب تغييرها لقلب HSVd ليصبح CPFVd وإن مناطق النطاقات لكل من P و V معبر عنها بشكل مستطيلات.

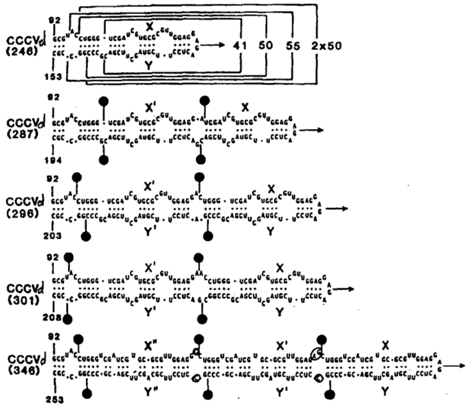
٣ ـ تنوعات التتابع فى فيرويدات أخرى:

Sequence Variants of Other Viroids

لقد ذكر أن هناك إختلافاً فى النيوكليتيدات فى تنوعات تتابع كانت قد وصفت فى PSTVd وبشكل أقل ذكرت فى CSVd. وكما قد ذكر سابقاً فى حالة CEVd و HSVd فإن معظم التغيرات تحدث فى نطاقى P و V.

أما فيرويد CCCVd فإنه يتميز عن جميع الفيرويدات الأخرى فى كونه نوع غير عادى من تنوع التتابع ينشأ منه مثل مرض كادانج ـ كادانج ويتقدم فى نخيل جوز الهند المصاب. إن التتابع فى عزلات CCCVd المأخوذة من نخيل محدد ومن أوراق ذات أعمار مختلفة ضمن نخلة مفردة أظهرت ثلاثة أنواع من تنوعات التتابع

بالإضافة إلى ٢٤٦ نيوكليتيد ةوهي القواعد الأساسية للأنواع. هذه تشمل C in-sertion في موقع ١٩٨ من نطاق C ومضاعفات نطاق T_2 بالإضافة إلى جزء من نطاق V من ٤١، ٥٠، ٥٥ أو ١٠٠ (٢ × ٥٠) نيوكليتيدة شكل ١٧ وطفرات في القواعد المجاورة للحدود لبعض التضاعف الجزئي. يبدو أنه لا يوجد هناك إختلافاً في نطاقي P و V في تسعة عزلات منفصلة من CCCVd مأخوذة من مناطق مختلفة في الفلبين والتي أيضاً تتعارض مع المواقع في الفيرويدات الأخرى.



شكل رقم ١٧ :

تضاعف التتابع في نطاقي V و T_2 للفيرويد CCCVd. إن طولي التتابع X و Y إما ٤١، ٥٠ أو ٥٥ نيوكليتيدة، تكون مضاعفة أما مرة واحدة في CCCVd (٢٨٧)، CCCVd (٢٩٦) و CCCVd (٣٠١)، أو مرتين في CCCVd (٣٤٦). تدل الأسهم في الجهة اليمنى على روابط في تتابعات X و Y بينما الدوائر المطموسة تدل على روابط التتابع المضاعف. الحروف المحاطة بدائرة تدل على إختلاف تتابع في تنوع التتابع.

رابعاً : ـ تشخيص الفيرويدات Diagnosis of Viroids :

مقدمة :

هناك متطلبات ضرورية لتحسين وتطوير الإجراءات لسرعة وتخصص اكتشاف الفيرويدات ذات الأهمية الزراعية ويجب أن تكون هذه الإجراءات جاهزة للاستعمال فى مثل تلك المعامل كما فى أقسام كليات الزراعة وشركات البذور بالإضافة إلى مراكز الأبحاث. فى حالة بعض المحاصيل، مثل البطاطس وفى تحليل عينات البذور فإن هذه الإجراءات يجب أن تسمح بإجراء الإختبار يومياً لكميات كبيرة من العينات. زيادة على ذلك فإن حساسية الطريقة يجب أن تكون عالية بشكل يكفى لاكتشاف موثوق به للمستويات المنخفضة لمسببات المرض الفيرويدى بالإضافة إلى أى تنوعات تتابع يمكن أن تحدث فى الحقل.

هناك عدة طرق استعملت وتستعمل فى الكشف عن وتشخيص الفيرويدات نذكر هذه الطرق للإستفادة.

١ ـ الإختبارات الحيوية Bioassays :

على نحو تقليدى فإن إجراءات التشخيص لمسببات الأمراض النباتية (الفيرويدات والفيروسات النباتية) هى إجراءات حيوية وتعتبر سهلة بشكل عام وتعتبر حساسة عند مقارنتها مع بعض الطرق الأخرى. منذ اكتشاف الفيرويدات سنة ١٩٧١ أجريت أبحاثاً كثيرة لإيجاد العوائل الطبيعية للفيرويد والتى تسمى العوائل المفرقة Differential hosts والتى تعطى أعراضاً جيدة. فمثلاً فيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار CPFVd يعطى أعراضاً مميزة فى الخيار لذلك ليس هناك حاجة للبحث عن عوائل معرفة أخرى. ولكن لسوء الحظ فإن معظم الفيرويدات الأخرى تظهر أعراضاً ضعيفة غير مميزة فى عوائلها الطبيعية الأخرى أو تسبب أعراضاً يمكن بسهولة أن تختلط مع أعراض مسببات أخرى. فمثلاً تقزم الاقحوان المتسبب عن CSVd تختلف أعراضه كثيراً بإختلاف أنواع الأقحوان التى يصيبها وكثيراً ما

يكون من الصعب توفر قاعدة تعريف تعتمد على الأعراض فى العوائل الطبيعية فقط. إلا أن الصنف المزروع Mistletoe تظهر عليه الأعراض على شكل بقع عديدة على الأوراق مميزة وبالتالى يمكن استعماله فى الفهرسة. فمثلاً تؤخذ قمم نبات ال Mistletoe وتطعم على النباتات المراد إختبارها، بعد حوالى سبعة أسابيع يمكن قراءة النتائج. إلا أن هناك عيوباً لهذه الطريقة.

أما بالنسبة لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd فإن الكاشف المناسب له مهم جداً بسبب أن الأعراض على البطاطس من الصعب التعرف عليها، زيادة على ذلك فإن الإصابة فى السنة الأولى عادة ما تبقى بدون أعراض، هذا يعنى أنه من المستحيل استبعاد الفيرويد من الأصول المستعملة للسنة القادمة. مع أن الفهرسة بالحقن فى نباتات الطماطم النوع Rutgers قد سبب تقدماً كبيراً فى التشخيص وأن نسبة كبيرة قد حلت، إلا أنه ليس كل الإصابات يمكن أن تظهر وتوجد وتحل بهذه الطريقة.

أجريت أبحاثاً كثيرة لزيادة تعبيرات الأعراض فى الإصابة الفيرويدية على نباتات الاختبار. وجد أن ظروف النمو مهمة جداً، درجات الحرارة المرتفعة والكثافة الضوئية وطول فترة الإضاءة بشكل عام تخفض مدة الكمون وتلائم ظهور تعبيرات الأعراض. ولكن لا يوجد قانون عام فى هذا الموضوع كما ذكر Diener سنة ١٩٧٩.

هناك قليل من العوائل التى تعطى بقعاً موضعية Local lesions عند الإصابة الفيرويدية (حيث أن هذه العوائل هامة فى التشخيص)، فمثلا فيرويد CSVd يسبب بقعاً موضعية على أوراق نبات **Senecio cruentus** بعد ١٢ ــ ١٨ يوم من الحقن. وكذلك وجد أن فيرويد PSTVd يسبب بقعاً موضعية على نبات **Scopolia sinensis**.

إن التشخيص بالطرق الحيوية هى إجراءات حيوية فى الطبيعة شاملة الحقن بالعصارة أو بالتطعيم لنباتات كاشفة. هذه الإختبارات التى يبدو بأنها حساسة ودالة

على طبيعة العدوى للعامل المسبب، قد ثبت بأنها غير فعالة إلى حد ما. إن التعبير العرضى (بالأعراض المرضية) لبعض المسببات الخاصة يكون معتمداً على الجينوتايب Genotype وال phenotype وبالتالى فإن تلك الدراسات لهذه الظاهرة تصبح مؤكدة معملياً وكثيراً ما تتطلب أصناف نباتات كاشفة وفترة حضانة طويلة.

فى حالة كثير من الفيرويدات فإن تكشف الأعراض عادة ما يأخذ وقتاً طويلاً عنه فى حالة الفيروسات. فمثلاً تكشف أعراض فيرويد ASBVd يحتاج من ستة شهور إلى أكثر من سنتين بعد حقن بادرات الأفوكادو القابلة للإصابة، وظهور الأعراض ليس مؤكداً ١٠٠ ٪. وبالتالى فإن هذا الإجراء الحيوى للتشخيص يكون عملياً فقط مع الفيرويدات مثل PSTVd والتى تظهر أعراضاً خلال ٢ ـ ٤ أسابيع على بادرات الطماطم. حتى فى هذا الإجراء يمكن أن تظهر بعض الصعوبات، فمثلاً بعض سلالات الفيرويد تعطى أعراضاً بسيطة جداً على نباتات الطماطم، وإن مثل هذه النباتات المصابة من الصعب تمييزها عن نباتات الكنترول السليمة. زيادة على ذلك فإنه نظراً لأن الفيرويدات المختلفة يمكن أن تعطى بشكل أساسى نفس الأعراض على بادرات الطماطم، لذا فإن إختبارات أخرى تكون ضرورية لتعريف الفيرويد الحقيقى المسبب لإحداث الإصابة.

كثيراً من المشاكل المذكورة سابقاً والتى ترافق الإختبارات الحيوية للكائنات الممرضة الفيروسية أمكن التغلب عليها باستعمال الإختبارات المبنية على السيرولوجى. إن أكثر هذه الإختبارات شيوعاً هو إختبار ELISA الذى هو Enzyme linked immunosorbent assay الذى استعمله Clark سنة ١٩٨٤ و Cooper سنة ١٩٨٦. يعتمد هذا الإختبار على التعرف على أو تمييز الغطاء البروتينى بواسطة الأجسام المضادة Antibodies، لقد ثبت أن هذا الإختبار موثوق به ومتعدد الاستعمالات. وعلى كل حال فإن إختبار ELISA لا يتلائم مع الفيرويدات نظراً لأن هذه العوامل المرضية (الفيرويدات) هى أحماض نووية RNAs غير مغلفة فهى تفتقر إلى الغطاء البروتينى وبالتالى لا يمكن اكتشافها بالطرق السيرولوجية.

٢ ـ الهجرة الكهربائية فى بولى اكريلايمدجيل:

Polyacrylamide Gel Electrophoresis

إن أول إختبار بيوكيميائى ـ بيوفيزيائى للفيرويدات كان طريقة الهجرة الكهربائية فى البولى اكريلايمد جيل (PAGE). هذه الطريقة اكتشفت بواسطة Morris & Wright سنة ١٩٧٥. وهى تعتمد على استخلاص الأحماض النووية من النسيج المصاب يتبع ذلك التحليل بواسطة Electrophoretic على ٥٪ polyacrylamide gel. هذه الطريقة أجرى عليها تحسينات وتتبع مع كثير من الفيرويدات.

تحتاج هذه الطريقة إلى يومين لكى تكتمل أما الإختبارات الحيوية مثلاً لفيرويد CSVd يحتاج ٤٩ ـ ٥٦ يوم. زيادة على ذلك فإن السلالات المعتدلة يمكن اكتشافها بسهولة كما هو الحال فى السلالات الشديدة. إن المأخذ الوحيد على هذه الطريقة هو عدد العينات التى يمكن أن تستعمل فى يوم واحد وهى محدودة فى ٢٠ ـ ٤٠ عينة. إلا أن هناك تحسينات أدخلت على هذه الطريقة بحيث يمكن استعمال ١٠٠ ـ ٢٥٠ عينة ويمكن اكثار الفيرويد فى نباتات الطماطم كخطوة وسيطة. هذه الخطوة الوسيطة حلت مشكلة كبيرة فى هذه الطريقة وهى مشكلة النسبة المنخفضة جداً من الفيرويد فى العينة النباتية.

هناك بعض الملاحظات على هذه الطريقة وهى أن سلوك الحزمة فى الجيل يختلف كثيراً مع النباتات مثل الأقحوان أو أنواع البطاطس المستعملة، وبالتالى فإن قراءة النتائج غالباً ما تكون صعبة جداً. لكن بالنسبة للفيرويد PSTVd فإن هذه المشكلة قد وجد لها حلاً عن طريق استعمال الطماطم كعائل وسيط. عندئذ فإن سلوك الحزمة لـ RNA المستخلص من نباتات الطماطم يكون جيداً، وهناك فائدة أخرى لإستعمال نباتات الطماطم وهى أن الفيرويد يتكاثر فى العائل الوسيط. وقد أجرى تحسين على هذه الطريقة وذلك باستبدال خطوة ال Dialysis

بخطوة Desalting باستعمال مرشح Sephadex. إن استعمال طريقة- Tomato PAGE لها ثلاثة مآخذ رئيسية هى:ـ

١ ـ تحتاج حوالى ستة أسابيع لاكتمالها.

٢ ـ تحتاج إلى جهد كبير.

٣ ـ تحتاج إلى تكاليف مادية كبيرة.

أما بالنسبة لاستعمال هذه الطريقة مع فيرويدات الخيار فمن الصعب وجود عائل وسيط لها.

٣ ـ الهجرة الكهربائية ثنائية الاتجاه:

Bi - Directional Electrophoresis

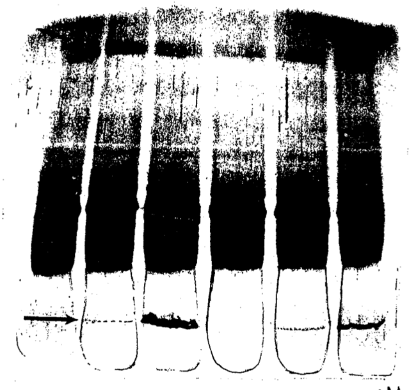
إن طريقة الصبغ بمادة Toluidin blue تستعمل عادة فى طريقة - Tomato PAGE وهى ليست شديدة الحساسية. إن استعمال طريقة صبغ أكثر حساسية يمكن أن تزيد كثيراً إمكانية اكتشاف الفيرويدات. وعلى أية حال إذا كانت الحزم فى الجيل الطبيعى يمكن أن تصبغ بنترات الفضة، فإن المنطقة بأجمعها التى فيها حزمة الفيرويد تعين ويكون لونها مسود بسبب وجود مستوى مرتفع نسبياً من الاضطرابات فى تلك المنطقة.

عند قطع حزمة الفيرويد بعيداً عن الجيل الفاصل ثم وضعها عند قاعدة جيل آخر، فإن موقع حزمة الفيرويد يمكن أن يتحـدد بسهولـة إذا أضيف -Xylene cya nol FF فى المنظم الحامل الأساسى ولكى يهاجر ال Xylene - cyanol FF أسرع إلى حد ما من الفيرويد. الجيل الثانى هو جيل مدنتر يحتوى ٧ مول يوريا ويسيل على حرارة ٦٥°م.

كما هو معروف فإن الفيرويدات هى جزيئات ذات تركيب دائرى، تحت ظروف الدنترة فإن الجزئ يفقد تركيبه المعقد وعند الهجرة الكهربائية فإن الجزيئات

الدائرية سوف تتحرك ببطء أكثر من الأفراد الملتوية (غير الدائرية). أما الجزيئات الأخرى الموجودة فى منطقة الفيرويد والتركيب المستقيم سوف لا تتأثر فى حركتها النسبية بواسطة التغير فى ظروف ال Electro phoretic. نتائج هذه الطريقة واضحة في شكل ١٨. كل الجزيئات المسببة للاضطرابات حول حزمة الفيرويد فى الجيل الأول تتحرك بسرعة أكثر نسبياً، بينما جزيئات الفيرويد التى تتحرك ببطء تكون موجودة بالقرب من موقع الإبتداء فى منطقة تكون خالية كلية من أى أحماض نووية أخرى والتى تسمح بالاستعمال لنظام الصبغ الحساس مثل نترات الفضة.

ولكى نثبت أن هذه المنطقة (الحزمة) هى فعلاً حزمة للفيرويد المطلوب، تقطع هذه الحزمة بعيداً عن الجيل ويستخلص الحمض النووى من الحزمة ويحقن فى نباتات كاشف (مثلاً الطماطم لفيرويد PSTVd) عندها تتكشف أعراض نموذجية لتلك الفيرويد.



شكل رقم ١٨ :

إختبار الهجرة الكهربائية ثنائية الاتجاه للفيرويد PSTVd. فى الجزء السفلى فى الجيل - الفيرويد - ملاحظ فى مستخلص النباتات المريضة ويشار إليه بالسهم.

تحضير العينات:

يؤخذ ١ غرام من الأوراق وتسحق فى ضاغط بينما يضاف ٠,٤ مول منظم الذى تركيبه (10 mM tris - HCl, I mM EDTA, 2% SDS, pH8) و ٠,٦ مول فينول مشبع بالماء يحتوى ٠,١ ٪ من 8 - hydroxyquinoline تضاف إلى عجلات الضغط، يضرب المخلوط ليتجانس لمدة ١,٥ دقيقة باستعمال Whirlmix. يوضع فى آلة الطرد عن المركز، بعد ذلك يؤخذ ٤٠٠ ميكولتر من العائم وترسب الأحماض النووية التى فيه بالايثانول. يعاد تعليق الكريات الصغيرة فى ٥٠ ميكولتر ماء وبعد إضافة ١٠ ميكولتر محلول مائى محتوياً ٤٠ ٪ سكروز، ٢٥,٪ من Xylene - Cyanol FF و ٠,١ ٪ بروموفينول أزرق، يوضع المخلوط كله فوق الجيل.

يمكن تبسيط الإجراءات كالآتى:-

تستمر الهجرة الكهربائية تحت الظروف الطبيعية حتى يصبح The Xylene - Cyanol FF فى قاع الجيل، بعد ذلك تعكس قوة القطبية ونفس الجيل يهاجر كهربائياً على حرارة ٧٥°م. فى هذه الحالة يمكن استعمال منظم واحد 20 mM tris ‏19 mM ‎H3 PO3، 0.06 mM EDTA pH 8.3 ، . هذا الإجراء يحتاج قليل من التعديل فى الصبغ بالفضة: يجرى غسيل وتثبيت لمدة ١٥ ثانية بدلاً من ٢ × ١٠ ثانية، يكون الصبغ بـ ٠,٠٩٥ ٪ نترات فضة بدلاً من ١٩,٪ نترات فضة. السائل المتكون يخفف بنسبة ١ : ١ بماء، هذا يحتاج لوقت من ١ - ٤٠ دقيقة. ويمكن ملاحظة ما يلى:-

١ - إن هذه الطريقة سريعة حيث أن الإجراء كله إبتداءً من قطف الأوراق حتى قراءة النتائج يكون فى حوالى ٨ ساعات.

٢ - الطريقة حساسة جداً حيث يمكن اكتشاف ٥ نانوغرام من الفيرويد / أثر فى الجيل. وبإجراء حسابات بالكمبيوتر يمكن أن نكتشف ١٠ نانوغرام فيرويد لكل غرام من الأوراق، وبهذه الحالة فإن هذه الطريقة تكون حساسة كما فى حالة طريقة التهجين الجزيئى (جدول ١٢).

٣ ـ هذه الطريقة أكثر أماناً حيث أنها مبنية على معيارين يصبح الفيرويد واضحاً عن طريق الصبغ وإن الصبغ يكون فى مكان منخفض فى الجيل وبالتالى فإن الفرصة الخاطئة بواسطة false positives (الكولونات الخاطئة) تكون منخفضة.

٤ ـ لا تتطلب كيماويات خطرة مثل الفسفور المشع.

جدول ١٢ : مقارنة بين طريقة الهجرة الكهربائية ثنائية الاتجاه BDE وطريقة التهجين الجزيئى لـ cDNA فى مقدرتها على اكتشاف فيرويد PSTVd.

الطريقة	الكمية المكتشفة		حجم العينة
	مطلقة	تركيز / غرام من الأوراق	
BDE	٥ نانوغرام	١٠ نانوغرام	٦٠ ميكولتر (٠,٥ غرام من الأوراق)
cDNA	١٢٥ ـ ٢٥٠ بيكوغرام	٢٠ ـ ٤٠ نانوغرام	٣ ميكلولتر (٠,٠٠٦ غرام من الأوراق)

وإذا وضعنا فى الاعتبار المعلومات الآتية:

١ ـ تركيز الفيرويد PSTVd ١٥٠٠ ـ ١٩٠٠ نانوغرام / غرام أوراق.

٢ ـ تركيز الفيرويد PSTVd ١٢٦٠ نانوغرام / غرام من القمة النامية فى النبات.

٣ ـ تركيز الفيرويد CSVd ١٢٠٠ نانوغرام / غرام أوراق.

يتبين لنا أن كلا الطريقتين تلائم متطلبات اكتشاف PSTVd و CSVd فى النباتات المريضة. كذلك فإن المعلومات تدل على أن العينات يمكن أن تختبر بنجاح. فى تجربة مع PSTVd وجد أن تحضير العينة كما سبق ذكره، بها نستطيع اكتشاف عينة مريضة واحدة مع ٤٩٩ عينة سليمة وأن حذف الترسيب بالإيثانول

واستعمال طور مائى مباشرة للهجرة الكهربائية، عندها يمكن إكتشاف عينة مريضة واحدة من بين ١٩٩ عينة سليمة.

٤ - التهجين الجزيئى Molecular Hybridization :

بسبب أن طريقة التهجين الجزيئى ذات حساسية عالية وتسمح باستعمال اعداداً كبيرة من العينات فى وقت واحد، لذلك يجب استعمال منقبات cDNA. يجب أن يحضر نسخة كاملة الطول من cDNA للفيرويد ويجرى لها كلونة فى البكتريا **E. coli**.

فى طريقة التهجين الجزيئى يؤخذ 3 UI aliquots من العصارة أو من مستخلص الحمض النووى من المادة المراد إختبارها وتوضع على Nitrocellulose filter. يرتبط الحمض النووى مع الفلتر عن طريق التحميص baking و-The Filter Pre - hybri dized. وبعد ذلك يحضن الفلتر مع العينات- p^{32} - nick - translated PSTVd cDNA وذلك لإحداث تهجين جزيئى فى هذه البقع حيث يوجد الفيرويد. هذه البقع تصطاد النشاط الاشعاعى الذى بعد ذلك يمكن اكتشافه باستعمال التصوير بالاشعاع الذاتى.

من كمية مطلقة فى الصغر ١٢٥ ـ ٢٥٠ بيكو غرام / بقعة وعلى إفتراض أن ١ غرام من الأوراق تحتوى ٠,٥ مل عصارة يمكن أن نحسب بأن هذا النبات فيه تركيز ٢٠ ـ ٤٠ نانوغرام من الفيرويد لكل غرام من الأوراق ويمكن أن تكتشف بهذه الطريقة. يمكن أن يضاف عينات كبيـرة إلى الفلتر. إلا أن هذه التجارب فشلت بسبب أن بعـض المواد لا ترتبط بشكـل خاص مع الفلتر وتفقـد خلال Pre - hybridization.

إن إختبار PAGE أقل حساسية ويمكنه أن يكتشف أى كمية مطلقة بحدود ٢٠٠ نانوغرام من الفيرويد لكل حزمة فى الاختبار، ويمكن أن يكتشف تركيز ١٠٠ نانوغرام من الفيرويد لكل غرام من الأوراق. أما طريقة cDNA تستطيع أن تكتشف ١٢٥ ـ ٢٥٠ بيكوغرام من الفيرويد لكل حزمة فى الإختيار، ويمكن

أن يكتشف ٢٠ ـ ٤٠ نانوغرام / غرام أوراق. يعود ذلك بسبب أن العينات تكون أكبر من طاقة PAGE منه فى طريقة cDNA.

مع أن إختبار التهجين الجزيئى عالى الحساسية ويمكن أن يستوعب أعداداً كبيرة من العينات إلا أنه ليس مناسباً للتطبيقات على نطاق واسع فى معامل وقاية النبات.

٥ ـ طريقة Dot - Blot Hybridiztion وتكتب DBH :

مقدمة :

إن أكثر طرق التشخيص حساسية وملائمة ومتخصصة لاكتشاف الفيرويدات ولا يزال استعمالها جارٍ هى الطريقة القياسية التى تسمى Standered dot - blot hybridization. كان أول تقرير عن اكتشاف كائن ممرض للنبات بواسطة إستعمال DBH عن الفيرويد PSTVd وذلك بواسطة العالم Owens et al سنة ١٩٨١. فى هذا التكنيك يستعمل شظية من حمض نووى (منقب Probe) إما مشعة أو غير مشعة. هذه الطريقة أصبحت شائعة الاستعمال الآن فى كثير من البلدان كطريقة روتينية لاكتشاف مجال واسع من الفيرويدات. على الرغم من أن طريقة DBH ملائمة التخصص وعالية الحساسية لبعض الفيرويدات حيث أنها يمكن أن تكتشف مدى منخفض جداً $١٠^{-١٢}$ غرام (picogram) فى كثير من المستخلصات النباتية، إلا أن لها بعض العيوب وهو طول الوقت اللازم للحصول على تحضيرات مستخلص النبات الشامل (٢٤ ساعة تقريباً) ويمكن أن تحتاج ٤٨ ـ ٧٢ ساعة لاكتشاف المنقب المرتبط. وبالتالى فإنه من المرغوب فيه أن يكون هناك تصميماً لطريقة أسرع، أبسط وحتى أكثر حساسية فى التشخيص.

إن الدراسات المبكرة التى كانت تجرى على تهجين الأحماض النووية الفيروسية فى النبات كانت تستعمل السائل أو محلول التهجين وذلك من قبل Gould & Symons سنة ١٩٨٣. فى هذه الطريقة يحضر خيط مفرد من cDNA فيه فسفور مشع ٣٢ (p^{32} - cDNA) مقابل لـ RNA لفيرس معين أو فيرويد وهذا يهجن فى

محلول لمدة ١٩ ـ ٢٤ ساعة مع تحضير من حمض نووى منقى جزيئاً من نباتات مصابة. عندئذ يعامل مخلوط التهجين بأنزيم Nuclease S1 والذى هو مخصص للأحماض النووية أحادية الخيط. تحت الظروف المستعملة فإن أى من p^{32} - cDNA احادى الخيط غير مهجن يجرى له عملية تحليل مائية إلى أحادى النيوكليتيدات أو قطعة صغيرة من قليلة النيوكليتيدات Oligonucleotides بينما لا يتأثر التهجين الناتج وهو p^{32} - cDNA : RNA، ما عدا التحليل المائى لأطراف أى حمض نووى احادى الخيط. بالإضافة لذلك فإن أى جزء من p^{32} - cDNA الموجود فى مناطق عدم التزواج يعنى (عدم التطابق Mismatched) من التهجين الخاطئ لـ:cDNA RNA فإنه يضهم. أما التهجينات الباقية الثابتة p^{32} - cDNA : RNA عندئذ تجمع بالترسيب الحمضى وتعد. كان الكنترول دائماً يشمل p^{32} - cDNA مهجناً مع نظيره RNA (هذا يعنى مع RNA الذى عنه كان قد حضر cDNA)، بسبب تهجينات الكنترول هذه فإنه ينشأ ٨٠ ـ ٩٠٪ من أقصى حد نظرى. بالاضافة لذلك فإن هناك Background control أساسى يتكون من منقب p^{32} - cDNA مهجن مع مستخلص حمض نووى محضر من نباتات سليمة.

هذا التكنيك وصف أساساً لفهرسة فيرويد ASBVd وله عدة إنتقادات هى: ـ

١ ـ الطبيعة المملة لهذا التكنيك نفسه.

٢ ـ يظهر قيم غير واضحة للكميات المحسوبة دائماً أو أحياناً.

٣ ـ غير مناسبة لدراسة كميات كبيرة من العينات.

وبالتالى فإن تكنيك التهجين فى السائل قد توقف حالياً بواسطة استعمال طرق أكثر كفاءة وحداثة من DBH.

إن أساسيات DBH سهلة حيث أن DNA أو RNA المدنتر يجمد فى مكانه على دعامة غير فعالة مثل نتروسليلوز أو أغشية نايلون بطريقة يمنع فيها التلدن

الذاتى Self annealing بجانب توفر تتابعات للتهجين مع منقب من حمض نووى مضاف. هذا المنقب يمكن أن يعلم بنوع من النظائر isotope(p^{32}) أو باشارى غير نظير nonisotopic ligand مثل بيوتين أو Digoxigenin أو معلم مباشرة بأنزيم Horseradish peroxidase أو alkaline phosphatase. بعد التهجين يجرى عملية غسل واسعة للراشح يزيل المنقب المهجن بنسبة بسيطة أو غير المتفاعل. يكون اكتشاف الهجن المرتبطة بواسطة أى من:ـ

١ ـ Autoradiography.

٢ ـ Enzymatic Colorimetric Detection.

٣ ـ Chemiluminescence.

بينما تعتبر طريقة DBH هى حالياً على نحو عام الطريقة الممتازة لتشخيص مسببات أمراض النبات، إلا أنه يجب أن نتذكر أنها يجب أن تشمل تطبيق مباشر على راشح الحمض النووى غير المجزئ. إن هذه الطريقة لا تميز حجم جزيئات الهجن وبالتالى فإن علامة التهجين تكون عبارة عن مجموع التتابعات المهجنة مع المنقب تحت الظروف المستعملة. هناك تكنيكان يسمحان بالتحليل الكيفى لأنواع الحمض النووى هى Northern blotting protocole و-Southern blotting proto cole. هنا فإن أنواع DNA أو RNA أولاً تقسم إلى أجزاء تحلل بواسطة ال Agarose أو بالهجرة الكهربائية فى الجيل-Polyacrylamide gel electrophore sis ثم بعد ذلك تنقل بواسطة Blotting من الجيل إلى مرشح نتروسليلوز بيولوجى والذى بعد ذلك يستعمل فى التهجين. تدل النتائج على إختلاف الحجم والكميات النسبية التقريبية للأنواع المفردة.

أ: التعرف على الفيرويد باستعمال منقبات مشعة:

Detection of Viroid by Using Radioactive Probes

إن طرق التعرف على الفيرويدات المبنية على طريقة DBH والمتضمنة استعمال منقبات مشعة قد استخدمت بنجاح فى السنوات الحديثة. لقد أثبتت هذه الطريقة

ثقة وحساسية كبيرتـين، وأمكن بواسطتهـا التعرف وإكتشاف الفيرويد الموجود على مدى منخفض جداً يقدر بالبيكوغرام فى كثيـر من عصارات النبات. كما هو واضح فى جدول رقم ١٣ قائمة بالدراسات التى استعملت فى هذا المجال للتعرف واكتشاف العديد من الفيرويدات فى المـدة من ١٩٨٥ ـ ١٩٩٠. كما يمكن أن نلاحظ فإن هذا التكنيك له مدى استعمـال واسع وهو فى الوقت الحاضر الطريقة الروتينية المستعملـة فى التعـرف على الفيرويد فى كثير من البلدان.

من جدول رقم ١٣ يمكن ملاحظة أن هناك أنواعاً مختلفة من المنقبات قد استعملت فى التعرف على الفيرويد من هذه المنقبات.

١ ـ cDNAs أحادى الخيط (هذا يحضـر أما بواسطة primer extension لإعادة الاتحاد فى الفاج M_{13} DNA أو بواسطة النسخ العكسى للحمض RNA الفيرويدى».

٢ ـ إعادة الاتحاد Recombinant لـ DNA ثنائى الخيط.

٣ ـ RNAs ذات خيط وحيد مصنعة فى المعمل.

٤ ـ نيوكليتيدات قصيرة محضرة صناعياً.

إن أكثر الطرق شيوعاً لتحضير المنقب هى إعادة الاتحاد لكلونات DNA، مثل هذه الكلونات تسمح بالعزل لكميات كبيرة من الحمض النووى، وهكذا تكون ضرورية للمدى الواسع من العمل التشخيصـى. وكـذلك فإنهـا تزود العمل بتخصص عال ومصـدر يمكـن تجديـده بسهولـة. هناك شرح كبير عن المنقبـات وتحضيرها واستعمالها مذكور بواسطة McInnes & Symons سنة ١٩٨٩ فى كتاب Nucleic acie probes.

جدول رقم ١٣ : دراسة Dot - blot Hybridization: التعرف على مدى من الفيرويدات باستعمال المنقبات المشعة من سنة ١٩٨٥ إلى سنة ١٩٩٠.

الفيرويد	رقم المنقب	المستخلص	مدى الحساسية على RNA فيرويد نقى بالبيكوغرام
ASBVd	١	حمض نووى منقى جزئياً	٥
	٣	عصارة ورقة افوكادو	–
	١	حمض نووى من ورقة افوكادو	–
ASSVd	٤	RNA الكلى، جلد ثمرة التفاح، قلف أو ورقة، بذرة.	–
CCCVd	١	حمض نووى ورقة نخيل جوز الهند.	–
CCCVd	١	حمض نووى، ورقة نخيل جوز الهند أو ورقة نخيل الزيت.	–
CEVd	١	عصارة الأقحوان أو حمض نووى من النبات. Gynura aurantiaca	٥٠ – ١٠٠
CEVd	٤ و ١	حمض نووى، ورقة حمضيات أو قلف ورقة أقحوان.	–
CSVd	٢	عصارة أقحوان.	٥
	٢	حمض نووى ورقة أقحوان.	–
	٥	عصارة أقحوان.	أقل من ١
HSVd	٢	حمض نووى ورقة حشيشة الدينار	–
PSTVd	٢	عصارة بطاطس، نموات بطاطس.	٨٠
	١	حمض نووى، ورق بطاطس أو طماطم.	–
	٢، ٤	مخلوط متجانس من ورقة بطاطس أو طماطم.	١,٤ – ١١,٢
	٢	حمض نووى خام، ورقة بطاطس أو طماطم.	٥٠
	١	حمض نووى ورقة بطاطس أو درنة.	–
	١، ٢، ٤	مخلوط متجانس من ورقة طماطم، ورقة بطاطس، تبرعمات بطاطس أو بذور حقيقية للبطاطس، درنة بطاطس.	٠,٣٣ – ١٠٠
	١، ٢	حمض نووى، ورقة بطاطس أو طماطم.	–
	٢	عصارة خلية ورقة طماطم.	٢٠
	٤	حمض نووى، ورقة طماطم.	حوالى ١
	٥	عصارة طماطم.	أقل من ١

أرقام المنقبات تعنى:

١ = خيط واحد من cDNA، ٢ = إعادة إتحاد بلازمد DNA ثنائى الخيط

٣ = قليل من النيوكليتيدات المصنعة، ٤ = Sp6 RNA Polymerase transcript.

٥ = T_3 or T_7 RNA polymerase transcript.

فيما يتعلق بطبيعة ونقاوة مستخلص الحمض النووى من النبات المنقول على نتروسليلوز أو نايلون، فإن العينات يمكن أن تختلف بشكل كبير (جدول ١٣). ومن الجدير بالاهتمام أن الفيرويدات بتركيبها الثانوى العال من RNA ترتبط مع النتروسيليلوز بدون متطلبات الخطوة الأولية من الدنترة، من المحتمل أن تحدث الدنترة خلال خطوة التحميص على درجة ٨٠°م in Vacuo لمدة ساعتين وذلك لتجميد عينات ال RNA على الفلتر. يحصل على أقوى علامات التهجين عادة باستعمال عينات غير بروتينية نظراً لأن التجمد المشترك للبروتين يتنافس مع الحمض النووى على مواقع الارتباط وتنضم أيضاً إلى ال Background. لهذا السبب فإن كثيراً من إجراءات طريقة DBH فى الاستعمال الحالى تستخدم درجة تنقية الفينول. على أية حال وكما يمكن ملاحظته من جدول رقم ١٣ فإن كلاً من عصارة النبات ونسيج الورقة المتجانس نسبياً يمكن أن يضاف إلى النتروسيليلوز مؤدية إلى إكتشاف الفيرويد.

لقد تم بنجاح تطوير طريقة مثالية من DBH بمنقبات p^{32} - cDNA للاكتشاف الروتينى لكثير من فيرويدات النبات. فمثلاً إن فيرويد ASBVd قد تم اكتشافه عند وجوده على مستوى منخفض يقدر بحوالى ٢٠ بيكوغرام لكل وزن غرام واحد من الأوراق الطازجة، باستعمال مستخلصات حمض نووى منقى جزيئاً. المنقب الذى كان يستعمل روتينياً هو خيط مفرد من cDNA معلماً بفسفور مشع ٣٢ وكان يحضر من إعادة الاتحاد لكلونة DNA محتوية على كلونة ذات طول كامل من ال monomer تدخل فى ASBVd فى الخيط المفرد من الناقل phage M13. هذا الموضوع أُثبت بأنه ذو فائدة كبيرة فى السنوات الأخيرة عند اكتشاف عديد من الفيرويدات فى مدى مختلف من مستخلصات نبات من استراليا.

لقد ذكر White & Bancroft سنة ١٩٨٢ أنه من الممكن إحداث زيادة معتبرة فى قوة إشارة الهجين بواسطة إجراء معاملة لفترة وجيزة للنسيج أو مستخلص الخلية بـ ٢٠ ٪ (W / V) فورمالدهيد لكل ١٠ × SCC محلول لمدة ١٥ دقيقة على ٦٥°م

قبل نقلها على النتروسيليوز وقبل تحميتها فى in Vacuo على درجة ٨٠°م لمدة ساعتين. عندما تضاف إلى مستخلصات نبات من الأقحوان، جوز الهند أو نخيل الزيت أو من البطاطس أو الطماطم لتشخيص الفيرويد فإن زيادة مشابهة فى قوة إشارة التهجين قد لوحظت. هذه الملاحظة يمكن أن تكون بسبب الدنترة الكمية للحمض RNA فى الفيرويد و / أو بسبب الأرتباط العال مع النتروسيليوز. ولسوء الحظ فإن المستخلصات المحضرة من نسيج نبات مصاب بـ ASBVd أو HSVd ومعامل بالحرارة مشابهاً لما هو فى حالة وجود الفورمالدهيد ويظهر روتينياً خفض فى قوة الإشارة بعد التهجين. هذا التأثير كان متغيراً إلى حد ما، بينما معظم المستخلصات أظهرت نقصان ملحوظ فى الإشارة، يعطى المستلخص العرضى نقصان غير ملموس. إن الطبيعة الحقيقية للعوامل الداخلة فى ذلك لم يجرى عليها إختبارات زيادة. وعلى أية حال فإن معاملة مستخلصات النبات المصاب بفيرويد HSVd و ASBVd فى غياب الحرارة قبل خطوات نقلها وتحميصها يعطى تقريباً زيادة الضعف فى قوة إشارة التهجين.

ب: التعرف على الفيرويد باستعمال منقبات غير مشعة:

Detection of Viroid by Using Non - radioactive Probes

١ ـ منقبات معملة بالبيوتين Biotin - Labeled Probes:

إن الحاجة إلى طرق تشخيصية روتينية للفيرويد مبنية على إجراءات بسيطة لا يستعمل فيها الإشعاع أصبحت الآن فى متناول اليد. هناك طرق عديدة متوفرة الآن فى تعليم الحمض النووى ومنقبات من نيوكليتدات قصيرة تسمى nonisotopically بواسطة إما تقنيات أنزيمية أو كيمياوية. يحوى جدول رقم ١٤ قائمة دراسات على طريقة DBH مستعمل فيها منقبات RNA و DNA معاملة بالبيوتين Biotinylated للتعرف واكتشاف مدى من الفيرويدات أجريت من سنة ١٩٨٨ ـ ١٩٩٠. ومن جدول رقم ١٤ يتبين لنا أن طريقة التعليم المفضلة حالياً لتعليم منقب الفيرويد nonisotopic هى التعليم بالبيوتين.

لقد استعملت المواد Photobiotin و Photoactivatalbe analogua of biothin لإنتاج منقبات من إعادة الاتحاد لـ DNA معامل بالبيوتين للتشخيص الروتينى للفيرويدات فى مستخلصات النبات. يتكون أل Photobiotin من بيوتين مرتبطاً مع ذراع رابط مشحون يوصل بمجموعة Photoreactive aryl azide. عندما يعرض مخلوط من حمض نووى و Photobiotin إلى ضوء قوى واضح لمدة ١٥ ـ ٢٠ دقيقة فإن مجموعة aryl azide تنقلب إلى aryl nitrene شديد التفاعل والذى يسمح بتكوين روابط مع الحمض النووى. مع أن الأصل الدقيق (الصحيح) ومواقع الروابط غير معروفة فإن الرابطة تكون ثابتة تحت ظروف التهجين القياسية ومن المفترض أنها تساهمية. تحت الظروف المحددة والموصى بها فإن بيوتين واحد يقترن مع كل ١٠٠ ـ ١٥٠ قاعدة من الحمض النووى. مثل هذا المدى من التعليم يكون من غير المحتمل لأن يتدخل فى تهجين المنقب المعامل بالبيوتين مع تتابعات الهدف المتتامة (المتممة لبعضها البعض).

إن منقبات DNA المعاد صياغتها Recombinant والمعاملة بالبيوتين المذكورة سابقاً تحتوى إما جزء من الطول أوالطول الكامل لـ monomer Viroid مغروزة فى ناقلات البلازمد pSP64 أو pUCq حيث تستعمل بنجاح للتعرف على PSTVd، ASBVd ، CCCVd، CSVd، HSVd فى مستخلصات حمض نووى منقى جزيئاً مأخوذ من أنسجة النبات. مستخلصات النبات المأخوذة من مدى واسع من عينات الحقل توضع على نتروسيليوز وتعرض للتهجين، DNA المعلم بالبيوتين الذى ارتبط مع الحمض النووى الهدف اكتشف عن طريق إتحاده مع - an avidin alkaline phosphate. تحت طريقة التهجين المعينة وظروف الغسيل، فإن كل منقب مفرد لفيرويد كان متخصصاً وكل فيرويد كان يكتشف بحساسية مشابهة لتلك المتحصل عليها عند استعمال نفس أو شبه المنقب المعلم بالفسفور المشع ٣٢.

جدول رقم ١٤: دراسات على DBH لاكتشاف مدى من الفيرويدات باستعمال منقبات غير مشعة. الدراسة من ١٩٨٨ ـ ١٩٩٠.

الفيرويد	نوع المنقب	تعليم المنقب	المستخلص	مدى الحساسية بالبيكوغرام
١ ـ ASBVd	١	فوتوبيوتين	حمض نووى، ورقة افوكادو	٥
٢ ـ CCCVd	١	فوتوبيوتين	حمض نووى، ورقة نخيل جوز الهند	لم تحدد
٣ ـ CSVd	١	فوتوبيوتين	حمض نووى، ورقة أقحوان	لم تحدد
٤ ـ CSVd	٣	Bio - 11 - UTP	عصارة أقحوان	٥
٥ ـ HSVd	١	فوتوبيوتين	حمض نووى، ورقة حشيشة الدينار	لم تحدد
٦ ـ PSTVd	١	فوتوبيوتين	حمض نووى، ورقة طماطم أو بطاطس	لم تحدد
٧ ـ PSTVd	٢	Bio - 11 - UTP	حمض نووى، ورقة طماطم	٨٠
٨ ـ PSTVd	٣	Bio - 11 - UTP	عصارة طماطم	٥

المنقبات:

١ = DNA بلازمد ثنائي الخيط معاد صياغته، ٢ = Sp6 RNA polymerase.

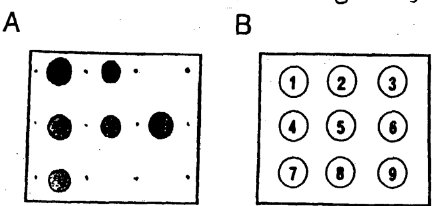
٣ = نسخة من T_3 or T_7 RNA polymerase.

يظهر فى شكل ١٩ دراسة نموذجية لطريقة DBH بدون إشعاع لاكتشاف RNA للفيرويد HSVd. حضرت مستخلصات من نسيج ورقة مصابة (بقع ٢، ٤ إلى ٧) أعطت إشارات موجبة للتهجين، بينما المستخلصات المحضرة من مواد ورقة سليمـة (بقع ٣، ٨، ٩) أظهـرت عدم التهجين. كما هو متوقع فإن ٢٠٠ بيكوغرام RNA لفيرويـد HSVd نقى (بقعة ١) أعطت إشارة تهجين قوية.

هناك طريقة بديلة لاكتشاف الفيرويد بواسطة وسائل غير مشعة، يكون باستعمال منقب RNA معامل بالبيوتين (Biotinylated RNA). هنا تتم معاملة RNA بالبيوتين فى فاج نظامى Sp6 عن طريق نظام نسخRNA polymerase باستعمال رايبونيوكليوتايد معاملة بالبيوتين (Bio - 11 - UTP) الذى يكون فيه

الرايبوز متناظراً مع Bio - 11 - deoxyuridine triphosphate والذى يكتب باختصار (bio - 11 - dUTP). مثال على ذلك لتحضير Sp6 RNA احادى الخيط معامل بالبيوتين لاستعماله كمنقب، فإن تتابع DNA مناسب يكلون أولاً فى ناقل مناسب والذى يحوى المحفز Sp6 قبل بدء النسخ من المنطقة عديدة الوصلات (ناقلات pSP64 و pS p65). بعد جعل DNA clone بشكل مستقيم بعد بدء النسخ من الجزء الداخل المكلون، فإن RNA المنسوخ ذو الطول المحدد ينتج بواسطة Sp6 RNA polymerase مستعملاً ATP، CTP، GTP وbio - 11 - UTP كمواد تفاعل.

بالإضافة إلى النظام المذكور سابقاً فإن فاج T_3 RNA polymerase وT_7 يمكن أن يستعمل بطريقة مشابهة. ولسوء الحظ فإن RNA Polymerase لثلاثة فاجات ($SP6$, T_7, T_3) تختلف فى مقدرتها على ادخال bio - 11 - UTP فى الحمض RNA. إن أنزيم الفاج T_3 يدخل bio - 11 - UTP بأعلى كفاءة وإنه يصنع تقريباً ثلاثة أمثال الحمض RNA المصنع بواسطة أنزيم الفاج SP6 وضعف ما يصنعه أنزيم الفاج T_7. وعلى أية حال فإن منقبات RNA المعامل بالبيوتين وجد أن استعمالها محدد فى تشخيص الفيرويد. كما هو فى جدول ١٤ استعمل فى اكتشاف CSVd وPSTVd فى مستخلصات النبات.



شكل رقم ١٩ :
اكتشاف فيرويد تقزم حشيشة الدينار فى أوراق حشيشة الدينار الاسترالى بواسطة التحليل بطريقة Dot - blot hybridization. عينة رقم ١ تعنى ٢٠٠ بيكوغرام منقى من RNA للفيرويد HSVd، عينة ٢ تعنى نسيج مصاب من فيرويد HSVd. عينة ٣ نسيج سليم من حشيشة الدينار. العينات من ٤ ـ ٩ عينات مأخوذة من نباتات نامية فى الصوبا الزجاجية. B مواقع العينات على غشاء نتروسليليوز.

٢ - منقبات معملة بالداى جوز جنين Digoxigenin labeled Probes :

إن مادة الداى جوزجنين عبارة عن ستيرويد نباتى والذى يتكون على وجه الحصر فى نبات Digitalis، يمكن أن يستعمل كإشارى بديل Alternative ligand للبيوتين وذلك لتحضير منقبات من RNA ومن DNA معاد صياغته. مع أن هذه الطريقة قد وجدت تطبيقاً مباشراً فى تشخيص الفيرويدات، إلا أنه لا يوجد أى سبب يوضح لماذا لم تقابل نجاحاً كبيراً. التعليم الأنزيمى للداى جوزجنين فى منقب DNA يكون متمماً بواسطة Random - primed أو Nick translated تندمج مع Digoxigenin - 11 - deoxyuridin triphosphate والتى تكتب باختصار (dig - dUTP) مستعملاً أنزيم Klenow أو بواسطة النهاية `3 لمنقبات DNA المعلم والذى هو أقل من ٢٠٠ قاعدة زوجية مع وجود أنزيم transferase الطرفى Terminal transferase. كما وأن المنقبات من RNA المعلمة بمادة داى جوزجنين يمكن أن تصنع فى المعمل بنسخ ال DNA أو الكلونة قبل بدء النسخ فى كل من SP6، T_7 أو مناطق المحفز أو تتابع الابتداء Promoter فى T_3 مع استعمال ال polymerase الخاص واستعمال dig - UTP كمادة تفاعل. كما وأن تعليم منقبات إما DNA أو RNA يمكن أن تتحقق بواسطة الأشعة فوق البنفسجية المحفزة catalyzed تندمج مع Photodigoxigenin أو كاشف يحتوى داى جوزجنين مرتبطاً مع ذراع مباعد مع مجموعة azido - Phenyl (Photoactivated). إن الإشعاع بالأشعة فوق البنفسجية ($260\ nm < \lambda < 300\ nm$) تؤدى إلى تفاعل غير معكوس ذو ازدواج ثابت واندماج حوالى واحد من الداى جوزجنين لكل ٢٠٠ - ٣٠٠ من المتبقى.

بعد التهجين مع الحمض النووى الهدف، فإن الهجن تعرف بواسطة ELISA باستعمال تزاوج الأجسام المضادة (هذا يعنى تزاوج Anti - digoxigenin alkaline Phosphate) وتفاعل لونى للمحفز الأنزيمى. إن اكتشاف المنقبات المعاملة بالداى جوزجنين بواسطة الكيماويات المتألقة Chemiluminescence يكون أيضاً إختيار

حديث، رؤية التألف تكون ممكنة عن طريق استعمال Anti - digoxigenin alkaline phosphate (أو عن طريق Anti - dioxigenin peroxidase) متزاوج أو متخصص مع مادة أو مواد التفاعل المتألقة.

٣ ـ منقبات معلمة بالكيماويات المتألقة:

Chemiluminescence labeled probes

إن إجراء عملية Dot - blot hybridization على أغشية نتروسيليلوز أو نايلون باستعمال الضوء كإشارة قابلة للاكتشاف في تفاعلات الكيماويات المتألقة، يكون أيضاً محتملاً في التعرف على الفيرويد. هنا فإن التعليم المباشر لمنقب الحمض النووى بمادة Horseradish Peroxidase HRP، يمكن أن ينجز بواسطة الطريقة التى طورها Renz & Kurz سنة ١٩٨٤. يعتمد هذا التكنيك أساساً على الوصل المتبادل لـ Horseradish Peroxidase مع Polyethyleneimine ومع P - benzoquinone متبوعاً بروابط متبادلة تساهمية، ما ينتج من ذلك يتحد مع DNA أحادى الخيط مستعملاً Glutaraldehyde. المنقبات الناتجة تمتلك حوالى تركيب واحد من HRP (٢ ـ ٣ جزيئات HRP) مع كل ٣٠ قاعدة. بعد التهجين لجزيئات الحمض النووى الهدف، فإن الاكتشاف يتم على فيلم بأشعة X وهذا ينجز خلال عملية Peroxidase - Catalyzed oxidation of luminol في وجود معزز Enhancer شكل ٢٠. تعرف هذه الطريقة باسم ECL والتى هى Enhanced chemiluminescence، بهذه الطريقة يمكن اكتشاف الأحماض النووية بمستوى بيكوغرام واحد مفرد (يعنى واحد من مليون مليون غرام) وتكون سهلة فى إعادة تكرارها.

نظام الكشف بالكيماويات المتألقة Chemiluminescent المبنى على أنزيم فوسفاتيز alkaline قد تم إنجازه الآن ويطبق بسهولة بسبب استعمال المادة الكيمياوية المتألقة الجديدة AMPPD واسمها بالتفصيل 4 - methoxy - 4 - (3 - Phosphatephenyl) spiro [1.2 - dioxetane - 3`, 2`- adamantane].

إن كلاً من منقبات الحمض النووى المعلم بالبيوتين المتحد مع-Avidin streptav-idin - alkaline phosphatase والمنقبات قصيرة النيوكليتيدات المعلمة مباشرة بمادة alkaline phosphatase يمكن أن تكتشف بسهولة على أغشية خلال تفاعلات تهجين عادية وباستعمال فلم أشعة X. إن الميكانيكية التى تؤدى إلى AMPPD الكيماوية المتألقة فى وجود alkaline phosphatase يشمل خطوتين وظاهرة فى شكل ٢١ . فى الخطوة الأولى يحدث فصل للفسفات بواسطة أنزيم alkaline phosphatase ويتولد مادة ثابتة نسبياً اسمها Dioxetane anion. أما الخطوة الثانية فتشمل تحطيم كبير للمادة Dioxetane anion لتكون مادة Adamantanone وتنتقل الشحنة ويتكون حالة مثارة (متهيجة) من مادة Methyl meta - oxybenzoate anion والتى ينبعث منها إضاءة. عند مقارنة حساسية كل من AMPPD ومادة الكروموجنك BCIP / NBT والتى تتكون من-5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indo-lyl - phosphate / nitro blue tetrazolium salt monohydrate.

فى التعرف على alkaline phosphatase. قد أجريت فى إختبار تهجين منقب DNA مع أنتجين DNA المركزى لفيرس التهاب الكبد B. إن حساسية الإختبار قد تحسنت بأكثر من رتبتين تكبير باستعمال موضوع الكيماويات المشعة وباستعمال مادة AMPPD أيضاً تقلل وقت الاكتشاف من ٢٤٠ دقيقة تقريباً إلى ٣٠ دقيقة.

$$\text{Luminol} + 2H_2O_2 \xrightarrow{\text{Horseradish peroxidase}} \text{3-Aminophthalate} + 2H^+ + 2H_2O + N_2 + h\nu$$

شكل رقم ٢٠ :

صيغة تفاعل الكيماويات المتألقة الداخل فيه ليمونول.

AMPPD → (Alkaline phosphatase, $HPO_4^{=}$) → Dioxetane anion → Adamantanone + Methyl meta-oxybenzoate anion → hv

شكل رقم ٢١ :
تفاعل الكيماويات المتألقة الداخل فيه AMPPD.

الإتجاهات المستقبلية لتكنولوجيا المنقب

Future Directions of Probe Technology

مقدمة:

بينما يعتبر إختبار Dot - blot hybridization ويرمز له DBH لاكتشاف الفيرويد من الاختبارات الشائعة الاستعمال كما هو واضح من جدول ١٤ ، ١٣ ، إلا أن هناك عدة إنتقادات له. لكى نستبعد المشاكل الأساسية فيما يتعلق بالمنقيات غير المشعة، فمن الإجراءات العادية هو تحضير مستخلص نباتى منقى جزئياً لعملية ال DBH، العملية التى تشمل عادة خطوة إزالة البروتين بالفينول و / أو الكلوروفورم على أية حال بينما النسغ (عصارة النبات) المعصور وغير المنقى يمكن أن يستعمل أحياناً (جدول ١٤)، هنا يمكن أن يحدث تخفيض فى حساسية الاختبار، وكفاءة تهجين المكونات الأخرى فى العينات السليمة تزداد. إن الحساسية المنخفضة ليست ذات إعتبارات هامة عندما يكون تركيز الفيرويد فى العصارة مرتفعاً نسبياً، ولكن يكون ذو إعتبارات هامة عندما يكون التركيز منخفضاً ومن المهم كشف جميع النباتات المصابة. ومثال على الحالة الأخيرة هو اكتشاف فيرويد ASBV فى أشجار الافوكادو مصممة على أساس استعمالها كأصل ليستعمل للبذور أو التطعيم الخشبى. هنا فإن خطوة إزالة البروتين وتركيز الحمض النووى قبل إختبار DBH يكون مطلوباً بشكل واضح.

هناك بالتأكيد حاجة إلى إجراءات إستخلاص بسيطة ويفضل تقليل الخطوات كلما أمكن ذلك واستبعاد استعمال الفينول لإزالة البروتين. وبالنسبة لأعداد كبيرة من العينات، فإن مستخلص النسيج يجب أن يكون غير معقد نظراً لأن الإجراءات المعملية العادية مثل التجانس فى الخلاط أو السحق فى هاون ومدقة تكون غير عملية. إلا أنه بوجود مستخلص للعصارة من ماركة Eric pollahne, Germany يكون ذو كفاءة عالية، ويمكن أن يستعمل للأنسجة الطرية مثل الطماطم، البطاطس وأوراق حشيشة الدينار وبالإضافة لذلك أوراق الأشجار الخشبية مثل الأفوكادو ونخيل الزيت. إن إختبارات ال DBH مملة أيضاً فى متطلباتها لنقل حجم صغير من كل عينة على غشاء فلتر والتسخين لتجميد الأحماض النووية قبل التهجين ثم عندئذ تهجن قبل الغسيل وقبل التصوير بالإشعاع الذاتى، يتكشف التلون الأنزيمى أو الكيماويات المتلألئة.

سيكون من المفضل تطوير تكنولوجيا منقب لتشخيص الفيرويد بحيث لا تكون الإشارة مثلاً منتج غير ذائب ملون على غشاء فلتر، ولكن يكون منتج ذائب ملون أو بعض المنتجات الذائبة الأخرى كلاهما يمكن أن يقاس بطرق مناسبة مثل ELISA والنتائج النهائية تطبع فى مكان معين. هذا الموضوع يكون أساسى لجعل نظام الكشف أوتوماتيكياً. وفيما يلى بعض الأبحاث المستقبلية لتشخيص الفيرويد.

١ ـ التزايد العددى الأنزيمى للحمض النووى الهدف:

Enzyme Amplification of Target Nucleic Acid

إن من المثير نوعاً ما للدهشة أنه مع جميع طرق الكشف المشعة وغير المشعة المتوفرة لتشخيص الفيرويد جدول ١٤، ١٣، فإن المستوى المنخفض فى الكشف

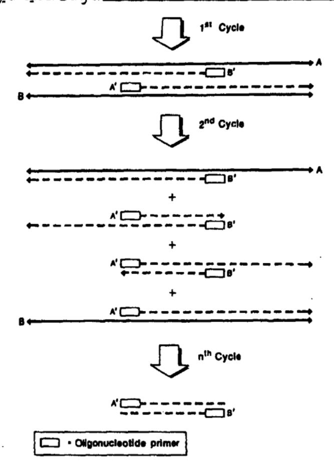
عن الأحماض النووية الهدف، يكون دائماً فى مستوى بيكوغرام منخفض. مع أن هذه الحساسية تكون دائماً ملائمة لمعظم الفيرويدات التى تكون موجودة بتركيزات مرتفعة نسبياً فى مستخلصات النبات. أيضاً فإن حساسية أكبر تكون مطلوبة بالنسبة للفيرويدات الموجودة على تركيزات منخفضة أو حيث يوجد قيوداً على كمية عينة النسيج المتوفر. من ناحية نظرية فإن حساسيـة الكشف يمكن أن تتحسن عن طريق زيادة عدد جزيئات الحمض النـووى الهدف فى العينة الأصلية. مثل هذا البحث قد تطـور وفقاً للزيادة العدديـة الأنزيمية التى تحدث فى تتابعـات الحمض النووى الخاصة بالهـدف فى المعمل بنمـط أُسى ودقة عاليـة. إن هذا التكنيك يشار إليه باسم طريقـة سلسلـة تفاعل البوليميريـز (PCR) Polymerase Chain reac-tionوهو موصـوف فى شكل ٢٢. إن طريقـة PCR مبنيـة على دورات متكررة من: –

١ ــ الدنترة بالحرارة لقالب ثنائى الخيط.

٢ ــ بادئ معاد إتحاده Annealing من مجموعة نيوكليتدات قصيرة.

٣ ــ إطالة البوادئ المعاد إتحادها بأنزيم DNA Polymerase.

يحدد الهدف المخصص عن طريق إختيار بادئين قصيرين (مثلاً ٢٠ ــ ٢٥ نيوكليتيدة) والتى تصمم لتهجن مع خيوط DNA المتقابلة مضافة إلى جانبى التتابع لتزداد فى العدد مع كون نهاياتها `3 تتجه إلى الداخل. تؤدى الدورات المتلاحقة من الزيادة العددية إلى استمرار التضاعف والزيادة الأسية فى عدد نسخ التتابع. نظراً لذلك يصبح هناك نسخاً مصنعة جديدة متوفرة لترتبط مع البادئ شكل ٢٢. وبالتالى فإن عشرين دورة من PCR تنتج نظرياً ما يزيد عن مليون ضعف من الأعداد المتزايدة.



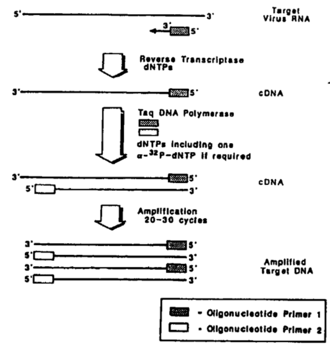
شكل رقم ٢٢ :

تضاعف DNA الهدف بواسطة سلسلة تفاعل البولى ميريز (PCR). قالب DNA الأصلى. A الخيط الأول وB للخيط الآخر. `A`, B بادئ النيوكليتيدات القصيرة. الخيوط المقطعة تمثل DNA المبنى فى المعمل.

وبشكل أولى فإن Klenow fragment من DNA Polymerase للبكتريا E. coli كان قد إستعمل فى PCR لإطالة البوادئ المعاد إتحادها Annealed. وعلى أية حال فإن هذا الأنزيم كان قد تثبط بواسطة الحرارة العالية المطلوبة لفصل خيطى الDNA فى بداية كل دورة من PCR. وبناء على ذلك يجب إضافة أنزيم جديد خلال كل دورة. إن إدخال أنزيم Taq DNA Polymerase الثابت حرارياً المعزول من البكتريا Thermus aquaticus حوّل عملية ال PCR إلى تفاعل بسيط وقوى، هذا

بدوره سمح بجعل هذا الإجراء أوتوماتيكياً مع فوائدة المهمة من سرعة، تخصصية، حساسية وملائمة.

قام العالم Rathjen سنة ١٩٨٩ بإجراء بحث يهدف إلى الزيادة العددية فى طريقة PCR كطريقة روتينية ممكنة للتعرف على المستويات المنخفضة من فيرويد ASBVd فى نسيج الأفوكادو المصاب. نظراً لأن PCR تتطلب قالب من DNA فيجب أن يصنع نسخة معكوسة من RNA الفيرويدى قبل الزيادة العددية. وبالتالى فإن هذا الإجراء يتطلب خطوتين عمليتين كما هو مذكور فى شكل ٢٣.



شكل رقم ٢٣:

مرحلتين من إجراءات اكتشاف مستويات منخفضة من RNA الفيروسى الهدف فى مستخلص نباتى باستعمال طريقة PCR. الخيط الأول هو cDNA ويبين بواسطة النسخ العكسى لقالب RNA. كما وأن التضاعف باستعمال PCR لـ cDNA يحصل عليه باستعمال Taq DNA بوليميريز.

خيط أولى مكمل من DNA وهو (cDNA) يجب أن يصنع بشكل أساسى بواسطة النسخ العكسى للقالب RNA فى وجود البادئ الأول وdNTPs. عندئذ يمكن أن يستعمل ال DNA كقالب للزيادة العددية فى PCR عن طريق إضافة البادئ الثانى وأنزيم Taq DNA polymerase. عادة ما يلزم إضافة أكثر من البادئ الأول و dNTPs. ولسوء الحظ فإن بناء الخيط الأول من cDNA الفيرويدى بواسطة أنزيم النسخ العكسى فى كثير من الأحيان يكون أقل كفاءة من نفس التفاعل المستعمل فيه mRNA كقالب بسبب المميزات العالية للتركيب الثانوى للفيرويدات، عندما يحدث لها إعاقة بواسطة التركيبات الثانوية للحمض RNA، فإن أنزيم النسخ العكسى يميل إما إلى البناء (النسخ) الطرفى أو ينقلب عكسياً ويبنى شريط ثانوى من cDNA ثم نسخه من الخيط الأول لـ cDNA الوليد. وبالتالى فإن العالم Rathjen وضع الظروف المثلى لدنترة الفيرويد قبل خطـوة النسخ العكسى.

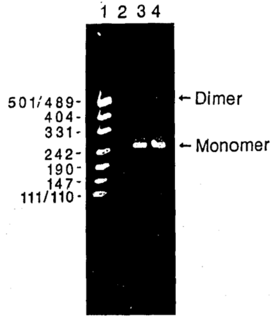
إن شكل ٢٤ هو النتيجة للزيادة العددية فى طريقة PCR المثلى (٣٠ دورة) باستعمال مستخلص حمض نووى منقى جزيئاً من أوراق أفوكادو سليمة ومصابة. إن الزيادة العددى الناتجة (ممر ٣ و٤) من المستخلصات المصابة توطدت وثبتت على ٣٪ TAE أجاروس جيل Agarose gel ويعمل على إظهارها بواسطةEthidium bromide fluorescence. يكون الانتاج الأساسى فى الإكثار ظاهر وبوضوح وبطول ٢٥٠ نيوكليتيدة تقريباً (باستثناء مونومرك ASBVd فيكون ٢٤٧ نيوكليتيدة) إن الحزمة ذات الوزن الجزيئى الأعلى ذات طول ٥٠٠ نيوكليتيدة تقريباً ظهرت على الجيل (ممر ٣ و٤)، من المحتمل أنها تتوافق مع تكاثرات ASBVd dimer والذى من المعروف أنه موجود بتركيزات منخفضة فى أوراق الأفوكادو. لم يكن هناك إنتاج واضح عند استعمال مستخلص أوراق سليمة كقالب (ممر ٢). هناك زيادة فى الحساسية على الأقل ١٠٠٠ ضعف لعملية ال PCR، هذه عند مقارنتها مع طريقة DBH القياسية بمنقبات حمض نووى معلم بالفسفور ٣٢.

جدول ١٥

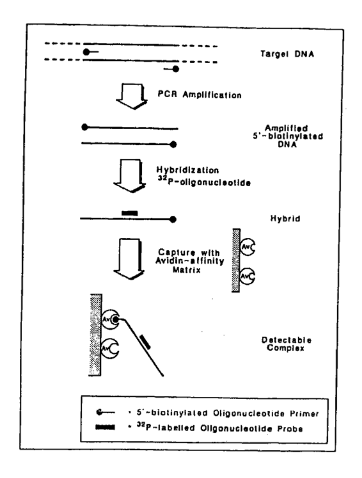
جدول ١٥ : طرق اكتشاف منتجات PCR .

METHOD	PCR round 1 Primers: P1, P2	PCR round 2 Primers: P3, P4	Labelling of PCR product	Detection
1 - Agarose gel electrophoresis	Nonlabeled	——	Nonlabeled	Ethidium bromide fluorescence
2 - Polyacry lamide gel electrophoresis	Non labeled	——	P^{32}	P^{32}- autoradiograpy
3 - Affinity collection with avidin (or streptavidin)	Biotin - labeled	——	P^{32}	Liquid scintillation counting
4 - Affinity collection with avidin (or streptavidin)	Biotin - labeled	——	Biotin	Hybridization with P^{32}- labeled oligonucleotide; liquid scintillation counting
5 - Affinity collection with avidin (or streptavidin)	Biotin - labeled	——	Biotin	Hybridization with alkaline phosphatase - labeled oligonucleotide; enzymatic colorimetric assay
6 - Affinity collection with avidin	Non labeled	P3, biotin - labeled; P4, dinitrophenyl (DNP) - labeled	Biotin / DNA	Immunoenzymatic colorimetric assay
7 - Affinity collection with avidin	Non labeled	P3, biotin - labeled; P4, I^{125}- labeled	Biotin I^{125}	Gamma Counting
8 - Affinity collection with DNA - binding protein, GCN4	Non labeled	P3, biotin - labeled; P4 contains GCN4 binding site	Biotin / GCN4 binding site	Enzymatic colorimetric assay
9 - Affinity collection with DNA - binding protein TyrR	Non labeled	P3, biotin - labeled; P4 contains TyrR binding site	Biotin / TyrR binding site	Enzymatic colorimetric assay

هناك أنواعاً من الطرق متوفرة حالياً للتعرف على ناتج ال PCR. إن جدول رقم ١٥ يذكر بعضاً من أكثر الطرق إنتشاراً والمستعملة حالياً. إن فحص ناتج ال PCR بعد الهجرة الكهربائية فى الجيل إما بـ Ethidium bromide fluorescence أو بالتصوير بالإشعاع الذاتى فسفور ٣٢ (جدول ١٥ طريقة ١ ، ٢). استعمال الوزن الجزيئى كتعريف منفرد. ومن سوء الحظ فإن إحدى المشاكل هنا هى الكلونات الخاطئة التى يمكن أن تنشأ إذا ظهرت ناتجات إكثار غير حقيقية لأشياء لها نفس الحجم تقريباً كما هو متوقع لفيرويد معين. يمكن التغلب على هذه المشكلة عن طريق الاكتشاف المتخصص لناتجات الإكثار بواسطة التهجين بمنقب مشع (داخلى) متبوعاً بطريقة مجموعة هجن القواعد المتجاذبةAffinity - based hybrid collection. هذا البحث (فى جدول ١٥ طريقة ٤) قد تطور أساسياً بواسطة Syva-nen et al سنة ١٩٨٨ لاكتشاف DNA فى فيرس تضخم الخلية فى الإنسان Cytomegalovirus متبوعاً بالإكثار فى PCR وطورت إلى أكثر حداثة بواسطة العالمet al Harju سنة ١٩٩٠ . يبين شكل ٢٥ الخطوات العريضة لهذه الطريقة.



شكل رقم ٢٤ :
طريقة الإكثار باستعمال PCR للحمض RNA فى الفيرويد ASBVd الموجود فى مستخلص ورقة أفوكادو يتبع خطوة نسخ عكسى أولية. شريحة ١ تعنى ٥٠٠ نانوغرام HpaII مهضومة فىpUC 19 DNA كدليل. شريحة ٢ = مستخلص ورقة أفوكادو سليمة. شريحة ٣ و٤ = مستخلص أوراق مصابة إصابات مختلفة من فيرويد ASBVd.



شكل رقم ٢٥ :

رسم تخطيطى يبين خطوات طريقة

Affinity - based hybrid Collection method لإكثار DNA الهدف بالبيوتين.

تستخدم هذه الطريقة منقبات معاملة بالبيوتين فى`5 لإدخال بقايا البيوتين فى أجزاء ال DNA الهدف خلال عملية الإكثار العددى فى PCR. إن أجزاء ال DNA المعاملة بالبيوتين فى `5 والمتكاثرة عندئذ يمكن اكتشافها بواسطة التهجين فى المحلول مستعملاً منقباً من مجموعة نيوكليتيدات قصيرة معلم بالفسفور المشع ٣٢. الهجن المعلمة بالفسفور المشع إما أن تجمع على-Avidin - coated polysty rene microparicles أو تجمع على Streptavidin - coated microtitre wells حاصلين على فوائد تفاعل البيوتين مع الأفيدين وهو ما يسمى Streptavidin. إن

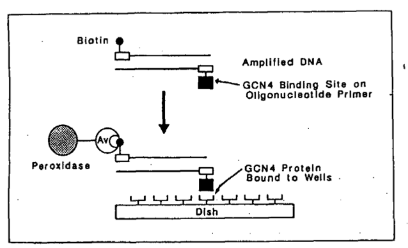
إشعاعية الهجن المرتبطة على دعامات صلبة يمكن عندئذ قياسها شكل ٢٥. إن طريقة مجموعة الهجن للقواعد المتجاذبة Affinity - based hybrid collection (ABHC) تكون فعالة وتكون مقياس لكمية ال DNA المنتج فى عملية الإكثار فى PCR.

هناك بديلاً للطريقة المذكورة سابقاً هو استعمال المنقب المتكون من Enzyme - linked oligonucleotide (الداخلى) لاكتشاف الناتجات المتكاثرة لـ PCR المعاملة بالبيوتين على 5` متبوعاً بطريقة مجموعة هجن القواعد المتجاذبة ABHC. جدول ١٥ طريقة ٥. من هذه المنقبات Alkaline phosphatase labeled يمكن أن يحضر فى المعمل حسب طريقة Li et al سنة ١٩٨٧. باستعمال مثل هذه الطريقة فقد أمكن اكتشاف الهدف فى DNA المتكاثر باختبار قياس الألوان Colorimetric لفيرويد ASBV باستعمال Para - nitrophenyl phosphate كمادة تفاعل واستعمال Avidin - coated microtitre plate كمادة صلبة ساندة، إلا أن هناك بعض العيوب لمثل هذه الطريقة.

هناك أبحاثاً عديدة قد طورت هذه الطرق وأدخلت فيها بعض الاختلافات، فمثلاً Sauvaigo et al سنة ١٩٩٠ استعمل دورتين من الإكثار فى PCR مستفيداً من الإجراء الثانى لـ PCR لإدخال بوادئ معاملة بالبيوتين وتحمل علامات فى مخلوط PCR (جدول ١٥ طريقة ٦ و٧). هذا أدى إلى إنتاج هجن من DNA تحمل جزء بيوتين على إحدى النهايات وداى نتروفينايل DNP معلم أو يود مشع ١٢٥ على النهاية الأخرى. بعدئذ فإن النواتج المتكاثرة تنتزع بواسطة جزئ البيوتين على Avidin - affinity matrix وبعد ذلك تكتشف باستعمال نظام Enzyme antibody أو عداد جاما.

أما العالم Kemp et al سنة ١٩٨٩ فقد أحدث تطوراً في إجراء الاكتشاف بقياس الألوان لنواتج ال PCR (جدول ١٥ طريقة ٨) مستعملاً DNA ثنائى

الخيط مرتبطاً مع بروتين اسمه GCN4 هذا البروتين عزل عن طريق استعمال ناقل تعبير خاص Constructed فى بكتيريا E. coli ، وهو بروتين إندماجى ويحتوى قطعاً من العامل الناسخ GCN4 من الخميرة Saccharomyces cerevisiae مندمجماً مع Glutathione S - transferase من Schistosoma japonicum . وبشكل أساسى فإن هذه الطريقة تشمل ربط GCN4 إلى Wells of microtitre plates بعدئذ يضاف DNA المتكاثر بطريقة PCR والذى فيه أماكن ارتباط لـ GCN4 مرتبطة مع مجموعة نيوكليتيدات قصيرة ومجموعة بيوتين مرتبطة مع مجموعة نيوكليتيدات قصيرة أخرى. الجزء المعرض من البيوتين عندئذ يكتشف عن طريق إضافة- Avidin Peroxidase conjugate متبوعاً بكشف البيروكسيديز بمادة تفاعل كروموجنك. هذه الطريقة مذكورة فى شكل ٢٦ . هناك أبحاثاً مشابهة (جدول ١٥ طريقة ٩) باستعمال أنواع مختلفة من البروتين المرتبط مع DNA مثل TyrR المأخوذ من E. coli قد تكلم عنه Triglia et al سنة ١٩٩٠ .



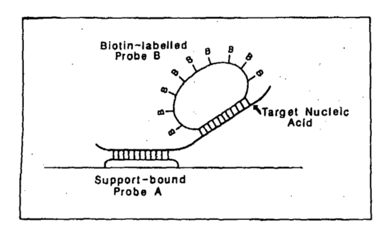
شكل رقم ٢٦ :

الكشف بالدليل اللونى لمنتجات PCR باستعمال DNA ثنائى الشريط مرتبط مع البروتين، GCN4 . إن DNA المكبر بواسطة PCR مبنى عن طريق ربط GCN4 بمواقع ملامسة بإحدى مجموعة النيوكليتيدات القصيرة ومجموعة بيوتين مرتبطة مع مجموعة نيوكليتيدات قصيرة أخرى.

٢ ـ اكتشاف الحمض النووى الهدف بطريقة ساندوتش هايبردايزيشن:

Detection of Target Nucleic Acid by Sandwich Hybridization

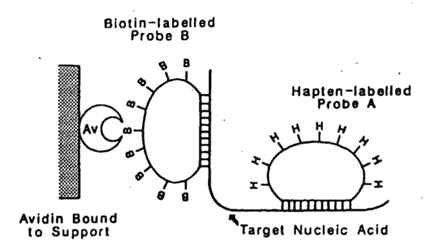
بينما طرق مجموعة هجن القواعد المتجاذبة ABHC لاكتشاف نواتج PCR المتكاثرة حملت آمالاً لتطبيقها على الفيرويدات، إلا أن الباحث يجب أن لا يتغاضى عن الإجراءات المبنية على طريقة Sandwich Hybridization (SH). إن العالم Ranke et al سنة ١٩٨٣ قد أدخل تطويراً أساسياً فى مرحلتى هذه الطريقة وذلك للاكتشاف والتقدير الكمى للأحماض النووية فى العينات المريضة الخام، باستعمال DNA لفيرس الغدة فى الإنسان كنموذج. إن الأساس العام لهذه الطريقة مذكور فى شكل ٢٧. باستعمال منقبات DNA أحادى الخيط فى الفاج M13 الناقل لـ DNA كمثال. من الضرورى أن يكون هناك منقبين كل منهما يتهجن مع مناطق مختلفة غير متشابكة من الحمض النووى الهدف. يرتبط أحد المنقبين مع المادة الصلبة الداعمة أو الساندة وهذه تكون مثل نتروسيليوز،Receptal surfaces ، Sephacryl ، Microtitre plate wells، أو مع أجزاء دقيقة مغناطيسية، بينما المنقب الآخر يعلم بالبيوتين مثل الفوتوبيوتين. إن ال DNA المرتبط بالمادة الصلبة الداعمة (المنقب الجاذب) يهجن مع عينات إختبار الحمض النووى فى وجود المنقب الثانى المعلم بالبيوتين (المنقب الكاشف) والذى يمكن أن يرتبط فقط مع المادة الصلبة الساندة عن طريق كوبرى أو جسر من الحمض النووى الهدف شكل ٢٧. بعد



شكل رقم ٢٧ :
شكل تخطيطى يوضح المبادئ الأساسية فى مرحلتى التهجين بالسندوش. يلاحظ المنقبين كمثال، منقب ذو خيط وحيد من DNA فى الفاج الناقل M13. إحداهما مرتبط إلى المادة الصلبة الداعمة A والآخر معمل بالبيوتين B.

إجراءات الغسيل العادية، فإن منقب الكشف المتجمد يقاس بواسطة التفاعل مع أفيدين أو ستربتافدين وأنزيم الربط.

لغاية الآن فإن الباحثين مدركون بأن طورى طريقة SH لم يستعملا لاكتشاف الفيرويدات ولا الفيروسات النباتية، إلا أن Keller et al سنة ١٩٨٩، ١٩٩٠ ذكر إمكانية استعمال إختبار Microtiter Sandwich hybridization فى اكتشاف تتابعات التكاثرات العددية فى PCR لفيرس نقص المناعة فى الإنسان HIV وتتابعات فيرس التهاب الكبد B (HBV) من سيرم المريض. فى الحالة الأخيرة فإن المنقب الجاذب (المكلون فى الفاج DNA M13 الناقل) ارتبط مع Microtitre Wells والمنقب الكاشف (المكلون فى الفاج DNA pB_{322} الناقل) قد عُلم ببيوتين ضوئى Photobiotin. كل منقب قد تجانس مع نصف تتابعات HBV المتكاثر سامحاً بتكوين تركيبة السندوش التى تجمد منقب الكشف المعلم فى Microtitre well كان التهجين فقط لمدة ٤ ساعات وبعد الغسيل فإن منقب الكشف المتجمد يقاس باستعمال Streptavidin - Peroxidase و Tetramethyl benzidine.



شكل رقم ٢٨ :

رسم تخطيطى يبين المبادئ الأساسية للطور المفرد فى تهجين السندوش يظهر المنقبان هنا. الأول معلم بالبيوتين B والثانى معلم بالهيباتين H ويظهر باسم منقب A أما الأول فهو منقب B.

هناك طريقة بديلة للطورين فى الإجراء المتبع فى طريقة SH تكون لكل من الحمض النووى الهدف وللمنقبين المهجنين فى المحلول. مثل هذا النظام (طور وحيد فى طريقه SH) أحدث تحسناً كبيراً فى الصفات الحركية، مؤكداً تأثير تحديد معدل السرعة لنظام Solid support - based . إن الخطوة الحرجة فى هذه الطريقة هى الفصل الملائم والمريح وذو الكفاءة العالية للمنقب (الهجن المقصودة من المنقب غير المهجن قبل اكتشاف الإشارة) . هذا يمكن الوصول إليه عن طريق ادمصاص معقد الهجن إلى مادة صلبة ساندة، يكون ذلك متبوعاً بالغسيل الكامل ١٠٠٪ فى المثال المذكور فى شكل ٢٨ فإن الأفدين المرتبط بالمادة الداعمة يستعمل لادمصاص منقب B المعلم بالبيوتين فى معقد الهجن. طريقة الاستخلاص هذه قد تكون بكفاءة حوالى ٣٠٪ فقط. الاكتشاف يكون خلال منقب A المعلم بالهبتين، ويمكن أن يستعمل Antibody - enzyme conjugate .

إن النظام المذكور سابقاً له إمكانية كبيرة فى التشخيص الروتينى للفيرويدات وفيروسات النبات باستعمال منقبات غير مشعة. مع أن تفاعلات التهجين تكون دقيقة نسبياً فإن مستخلصات النبات وإجراءات الكشف يجب أن تكون سريعة وموثوقة أثناء إجراءها.

مراجع خاصة بالفصل الثالث

1 - Allison, R., Thompson, C. and Ahlquist, P. 1990. Proc. Natl. Acad Sci. USA. 87, 1820.

2 - Clark, M. F. and Bar - Joseph, M. 1984. Methods in Virology. Academic Press New York.

3 - Cooper, J. I. and Edwards, M. L. 1986. Applied Biology, Wellesbourne U. K. 139.

4 - Diener, T. O. 1979. Viroids and viroid diseases, John Wiley & Sons, New York.

5 - Gould, A. R. and Symons, R. H. 1983. Annu Rev. Phytopathol. 21 ; 179.

6 - Gross, H. J. et al. 1982. Eur. J. biochem. 121, 249.

7 - Harju, L. et al 1990. Mol. Cell. Probes 4, 223.

8 - Kemp, d. J. et al 1989. Proc Natl. Acad Sci USA 86, 2423.

9 - Keese, P. and Symons, R. H. 1985. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 82, 4582.

10 - Keese, P., Visvader, J. E. and Symon, R. H. 1988. Variability of RNA Genom CRC Press, Boca Baton - FL.

11 - Koltunow, A. M. and Rezaian, M. A. 1989. Intervirology 30 : 194.

12 - Keller, G. H. et al. 1989. Annal Biochemi 177 : 27.

13 - ——— , ———1990. J. Clin Microbiol. 28 : 1411.

14 - Li, R. et al. 1987. Nucleic Acid Res. 15 : 5275.

15 - Luria, s. E. et al. 1978. General Virology. 3rd edition. New York, Wiley. 578p.

16 - Lwoff, A. 1981. Ann. Virol. 132 E (2) : 121 - 134.

17 - Morris, T. J., Wright, N. S. 1975. Amer. Potato J. 52 : 57 - 63.

18 - Owens, R. A., Diener, T. O. 1981. Science. 213.

19 - Rathjen, J. P. 1989. B. Sc. (Honours) Thesis, University of Adelaide.

20 - Renz, M. and Kurz, C. 1984. Nucleic Acid Res. 12 : 3435.

21 - Rank, M. et al. 1983. Gene., 21 : 77.

22 - Sauvaigo, S. et al. 1990. Nucleic Acid Res. 18, 3175.

23 - Shikata, E. 1990. New Viroids From Japan. Semi. Virol., 1 : 107.

24 - Syvanen, A. C. et al. 1988. Nucleic Acid Res. 16 : 11327.

25 - Triglia, T. et al. 1990. Nucleic Acid Res. 18 : 1080.

26 - White, B. A., and Bancroft, F. C. 1982. J. Biol. Chem., 279 : 8569.

27 - Wilbur, W. J. and Lipman, d. J. 1983. Proc Natl, Acad. Sci. USA 80 : 720.

الفصل الرابع

دراسات تطبيقية على الفيرويدات

أولاً :- بناء فيرويد معدى فى المعمل:

In Vitro Synthesis of an Infectious Viroid

مقدمة :-

الفيرويدات هى ممرضات للنبات تتميز عن الفيروسات بغياب الغطاء البروتينى وباحجامها الصغيرة وهى جزيئات من RNA أحادى الخيط دائرية تتكون من بضع مئات من النيوكليتيدات. أصغر فيرويد فيه ٢٤٠ نيوكليتيدة وأكبر فيرويد فيه ٣٧٥ نيوكليتيدة (ذكر Steger et al سنة ١٩٩٢ أن هناك فيرويد بطول ٦٠٠ نيوكليتيدة، إلا أنه لم يذكر إسم هذا الفيرويد ولا وصفه وسيأتى ذكر الخطأ الذى وقع فيه الباحث). لا يوجد أى تجارب أثبتت بأن الفيرويد يستطيع أن يشفر لأى بروتين ولا لأى نواتج ترجمة. وبالتالى فإن الباحث يجب أن يفترض أن تناسخ الفيرويد ومرضيته تعتمد كلية على نظم أنزيمية فى العائل. إن المعلومات الوراثية فى الفيرويدات تكون فى تركيب RNA. كذلك فإن للفيرويدات المقدرة لأن تخضع لتركيبات خاصة إنتقالية وتستطيع أن تتفاعل مع بعض عوامل خلية العائل.

ملاحظة «قام بهذا البحث مجموعة من العلماء فى استراليا ومجموعة أخرى فى ألمانيا والذى أمدنى بالبحوث مشكوراً الدكتور M.A. Rezaian والدكتور D. Riesner.

إن النموذج الحديث لتناسخ الفيرويد يفترض ميكانيكية الدائرة الملتفة. يمكن ذكر هذه الميكانيكية باختصار ونقول بأن الفيرويد الدائرى (خيط موجب) ينسخ إلى Oligomeric خيط سالب من RNA. الخيط السالب هذا يعمل كقالب لبناء Oligomeric خيط موجب من RNA. كلتا خطوتى النسخ يحفزان بواسطة أنزيم العائل RNA Polymerase II المعتمد على DNA. أما الخيط الموجبOligomeric RNA ينشطر أنزيمياً إلى جزيئات ذات وحدة طول والذى بعد ذلك يلتحم ليكون دوائر فيرويد تامة mature. إن الانشطار الذاتى والالتحام الذاتى لا نستطيع تأكيد صحتها بالرغم من التجارب العديدة. هناك استثناء لهذه العملية موجود فى فيرويد ضربة الشمس فى الأفوكادو حيث أن جزيئات وحدة الطول تتكون بواسطة الانشطار الذاتى فى ال Oligomers، لا يوجد أنزيم يشارك خلال خطوة البناء هذه. يجب على الباحث أن يفترض بأن الدقة فى قطع ولحم وسيطات التناسخ من ال Oligomeric يكون نتيجة للتحديد الجيد للتركيب الثانوى للموقع. ويجب التأكد من أن الفيرويدات كجزيئات متطفلة لا تزود العوامل الخاصة بها فى خلية العائل بأى إجراء وأن عوامل التجهيز تلك الخاصة بخلية العائل لا تتكيف مع الفيرويد. وبالتالى فإنه على نقيض واضح مع بناء RNA العائل فإن التركيب الثانوى للفيرويدات ووسيطاتها فى التناسخ يكون لها الدور السيادى فى الخلية.

دبابيس الشعر:

إن التركيب والتركيب الانتقالى للفيرويدات معروف بشئ من التفصيل. تحت الظروف الطبيعية فإن الفيرويدات تشكل تركيب شبه عصوى والذى يمكن وصفه بأنه تركيب متسلسل من حلزونات قصيرة مع عروات داخلية صغيرة. أثناء الدنترة بالحرارة فإن الفيرويدات تمر بعدة تركيبات إنتقالية من التركيب شبيه العصوى إلى دائرة أحادية الخيط بدون أية أزواج قواعد بين الجزئ. فى الاتحادات العالية الانتقالية الرئيسية فإن جميع ازواج القواعد للتركيب الطبيعى تتعطل وتنفصل ويتكون تركيب واضح جديد ثابت يسمى دبوس الشعر، وهى ثلاثة دبابيس،

دبوس الشعر I، II، III. هذا التحول يمكن رؤيته كسوط ذو تركيب ممتد إلى متفرع مع فقد واضح فى تزاوج القواعد. أما على درجات الحرارة الأعلى فإن دبابيس العشر الثابتة تنفصل باستقلالية عن بعضها البعض حسب درجة ثباتها فى الحرارة. إن دبوس الشعر I و II تكون أكثر ثباتاً وحفظاً بين الفيرويدات المختلفة أكثر من بقية الجزئ مع الأخذ بعين الاعتبار موقع، طول ومحتوى القواعد G + C. أما دبوس الشعر رقم III فإنه يوجد فقط فى الفيرويد PSTVd وبالتالى فإن أهميته جانبية.

لقد درس حديثاً العلاقة الوظيفية لدبوس الشعر II عن طريق الموقع المباشر للطافرات وطرق ال Thermodynamic وإختبارات الحيوية بواسطة Loss et al سنة ١٩٩١. ولقد تبين أن دبوس الشعر II يتكون ليس فقط خلال الدنترة بالحرارة للفيرويدات الدائرية ولكن يمكن أن يتكون خلال بناء وسيطات تناسخ الفيرويد، ومن المحتمل أن تكون هذه الخطوة أكثر أهمية من ناحية بيولوجية حيث أنه يكون جزء من التركيب شبه المستقر. أظهرت الدراسة المستفيضة أن الطفرات التى تحدث فى القطع التى تشكل دبوس الشعر II وإختبارات الحيوية مع cDNA للفيرويد المتحول أن المنطقة المركزية لساق دبوس الشعر II هى المنطقة الحرجة فى تناسخ الفيرويد. ولدى الأخذ بعين الاعتبار المعلومات الواردة فى كثير من المراجع على مواقع الارتباط لكثير من عوامل النسخ، هذه الأبحاث تشير إلى الفرضية بأن دبوس الشعر II يعمل كموقع ارتباط لعوامل النسخ فى خلية العائل.

هناك كثير من التقارير فى المراجع تدل على أن المنطقة المحتوية دبوس الشعر I يمكن أن تكون موجودة فى بناء ال Oligomeric وسيطات للتناسخ. يتكون دبوس الشعر I فى منطقة من الجزئ التى تظهر تماثل تتابع قوى بين كل الفيرويدات من مجموعة PSTVd هذه القطعة تسمى (UCCR) Upper central conserved Region. فى حالة PSTVd لقد ذكر حديثاً أن RNase T_1 يكون قادراً ليحفز فى لمعمل كلاً من تفاعل القطع واللحم بدون الحاجة إلى أى بروتين

آخر Tsagris et al سنة ١٩٩١. وكعمليات فرضية لتفاعل التجهيز، فإن دخول أنزيمات مشابهة يمكن تخيلها ضمن خلية النبات. زيادة على ذلك نظراً لأن PSTVd يمثل فى كثير من الاعتبارات على أنه صف Class كبير من الفيرويدات، فإن المقدرة على التجهيز بواسطة RNase T_1 يمكن أيضاً أن يلزم للفيرويدات الأخرى. لمثل هذه الدراسة فإن العالم السابق ذكره استعمل نسخة مستقيمة أطول من وحدة الطول (٨٥ نيوكليتيدة إلى ٣٥٩ لكل واحد إلى ١٠٦ بإضافة ١٢ نيوكليتيدة على النهاية `5 وبإضافة ١٣ نيوكليتيدة على النهاية `3)، وبالتالى فإن النسخة تحتوى على الجزء المركزى من UCCR بمقدار الضعف، على النهاية `5 ونهاية `3. إن أربعة من vector -`5 النيوكليتدات المجاورة للتتابع النوعى لـ PSTVd تكون متماثلة لتتابع G80 PSTVd إلى U 83، وبالتالى فقط فإن ال C84 تكون غائبة من خمسة نيوكليتيدات أطول فى PSTVd المتخصص الممتد على النهاية `5 للنسخة. إن الموقع G80 قد تحدد كموقع للقطع وإعادة اللحام فى نسخة RNA ذو الخيط الموجب بواسطة RNase T_1. نظراً لأن هذه النسخة غنية بالكثير من مواقع G التى عليها apriori قطع ولحام يمكن أن يؤدى إلى دوائر مضبوطة من PSTVd، ولكن التفاعل الكامل كان ملاحظاً فقط على G80. من هذا يمكن الاستنتاج بأن التفاعل يكون موجهاً بواسطة تركيب ثانوى خاص للنسخ.

بناء فيرويد CEVd فى المعمل:

لقد استعملت كلونات cDNA الفيرويدية المعدية على نطاق واسع لدراسة التتابع المطلوب لتضاعف ومرضية الفيرويد بواسطة طريقة-Site Directed mutagene sis. كما وأن حيوية كلونات DNA ونسخها الخاصة تعتمد على وجود تتابع فى فيرويد أطول من وحدة الطول فى تركيبات ال DNA. بعض كلونات ال Monomeric أيضاً تكون معدية كنتيجة لتزامن وجود تتابعات الفيرويد فى

الجزيئات الناقلة والتى تؤدى إلى تكوين أطول من وحدة الطول لـ cDNAs. تحتوى تحضيرات الفيرويد من النباتات على نسبة من الجزيئات فى شكل مستقيم والذى يكون عالى الحيوية (معدى) ويبدو أنه يحتوى على نهايات -cy -`3 ,`2 clic phosphate والتى ذكر بأنها ضرورية للحيوية (العدوى).

فى هذا البحث نذكر طريقة بناء فيرويد اكسوكورتز الحمضيات المعدى بنفس الطول فى المعمل، لنسخ ال Monomer وفيرويد دائرى CEVd موثوق به دون اللجوء إلى إجراءات الكلونة. تحتوى النسخ المعدية نهايات triphosphate -`5 و-`3 OH وفى هذا البحث أمكن إثبات أن 2, 3 - cyclic phosphate ليست خطوة أولية Prerequisite فى الحيوية.

١ - إكثار وتنقية فيرويد CEVd:

تجهز نباتات طماطم **Lycopersicon esculentum** Mill cv. Rutgers فى طور النمو الفلقى وتحقن ميكانيكياً بسلالة شديدة من فيرويد CEVd وتحفظ على درجة حرارة ٢٧ ـ ٣٠°م كما فى الطريقة التى ذكرها Rezaian et al سنة ١٩٨٩. بعد ظهور الأعراض يؤخذ مستخلص الفيرويد من النباتات (حسب طريقة Rezaian سنة ١٩٩٠) وينقى ويتم ذلك بواسطة الكروماتوغرفى السليلوزية ثم يتبع ذلك طريقة الهجرة الكهربائية فى الجيل ثنائية الاتجاه كما ذكرها Rezaian سنة ١٩٨٩.

٢ - بناء cDNA:

يتم بناء cDNAs ثنائية الخيط بواسطة عملية النسخ العكسى الموحد Combined reverse transcription ويجرى عملية إكثار amplification باستعمال CEVd نقى كقالب وإن واحداً من الزوجين المختلفين من Oligonucleotide المصنعة تستعمل كقالب شكل ٢٩. تبنى مجموعة النيوكليتيدات القصيرة Oligonucleotides باستعمال طريقة Applied Biosystems 391 DNA Synthesizer وتنقى على لفائف OPC حيث أنها تصمم بطريقة معينة.

يلزم فى هذه العملية ستة بوادئ primers ويرمز لها P_1، P_2، P_3 وتركيبها كالآتى: -

[dGCCGCCTCTTTTTTCTTTTCCTGCCTGCAGGG] = P_1

[dTAATACGACTCACTATAGGGGGAAGAAGTCCTTC] = P_2

[dGGAGAGCAGTGAAGATACAAGAAAAGGGGTT] = P_3

[dTAATACGACTCACTATAGGGCGAGGGTGAAAGC] = P_4

وهناك P_5، P_6 سنذكرها فيما بعد.

يتكامل P_1 مع P_3 حيث أن مركز 38 مع 69 فى (P_1) و300 مع330 (P_3) شكل (٢٩) مـن CEVd - A. أما P_2 وP_4 تشتمـل T_7 RNA polymerase محفز 18 - residues1 وتتابعات CEVd ذات المعنى Sense متوافقة مع - residues 70 86 (P_2) و 331 - 346 P_4 من هذا الفيرويد (شكل ٢٩). إن G ذات الموقع ١٨ المكتوبة بخط أسود غامق فى الشكل هى فى هذه البوادئ مشتركة للقطعتين ومتوافقة مع الموقع ٧٠ فى P_2 أو ٣٣١ فى P_4 فى جزئ CEVd .

يؤخذ ٥٠ نانوغرام من CEVd - A وتمزج مع ١٠٠ ضعف مولر زيادة لكل من هذه البوادئ المنتقاة وتسخن على ٨٥°م لمدة ٢ دقيقة. بعد ذلك يجرى عملية نسخ عكسى مرتبط وإكثار عددى فى ٥٠ ميكولتر تشتمل القالب والبوادئ، ١٠ ملى مول Tris - Hcl (على درجة حرارة الغرفة العادية ٢٥م ورقم حموضة ٨,٣)، ٥٠ ملى مول KCl، ٢ ملى مول $MgCl_2$، ١٠ ميكو غرام / مللتر جلاتين، ٢٠٠ ميكرومول لكل dNTP، وحدتين AMV من أنزيم النسخ العكسى Promega، ووحدة واحدة من أنزيم Taq DNA Ploymerase (Promega) يحضن المخلوط على ٤٢م لمدة ١٥ دقيقة يتبع ذلك ٣٠ دورة PCR على جدول مقسم حسب الآتى: ١ دقيقة على ٩٤°م، ٢ دقيقة على ٥٥°م، ٣ دقيقة على ٧٢°م. إن

ال DNA الذى ازداد عدده عومل بأنزيم RNase (١٠ ميكوغرام / مل على ٣٧ْم لمدة ٣٠ دقيقة) وتنقى بواسطة الهجرة الكهربائية فى أجروس منخفض نقطة الذوبان.

٣ ـ النسخ فى المعمل In Vitro transcription :

يحضر قالب DNA (١٠٠ نانوغرام) وينسخ بأنزيم T_7 RNA Polymerase بشكل أساسى كما هو مذكور فى طريقة Melton et al سنة ١٩٨٤. بالإضافة إلى القالب فإن التفاعلات تشتمل ٠,٥ ملى مول لكل rNTP و٤٠ ملى مول - Tris HCl, pH 7.6 و ٦ ملى مول كلوريد مغنيسيوم و ٠,١ ميكوغرام لكل ميكولتر أسيتيلتيد BSA (Promega)، ٥ ملى مول DTT و ٠,٢ وحدة ميكوغرام لكل ميكولتر أنزيم T_7 RNA Polymerase فى حجم كلى من ١٠٠ ميكولتر. يتبع ذلك التحضين على درجة ٣٧ْم لمدة ٣٠ دقيقة. المخاليط المنسوخة تستعمل إما مباشرة للحقن أو تعامل بـ ٠,١ وحدة لكل ميكولتر RNase - Free DNase أو مائة ميكوغرام لكل ملتر DNase - Free RNase على درجة حرارة ٣٧ْم لمدة عشرة دقائق قبل الحقن. تختبر مهضومات النيوكلييز بواسطة عينات Electrophoresing لكل مخلوط تفاعل على Polyacrylamide gel مدنتر ٦٪ محتوياً ٨ مول يوريا يتبع ذلك الصبغ بالفضة. تكون النسخ المعدة للاستعمال فى نهاية تفاعلات التكيف (التعديل) قد استخلصت بالفينول وأجرى لها ترسيب بالايثانول قبل المعاملات الأخرى.

٤ ـ تحوير خمسة فتحة الطرفية وتحليق نسخ RNA:

Modification of 5`- termini and Circularization of RNA transcrips.

إن جزيئات RNA المنتجة بواسطة النسخ فى المعمل تحتوى نهايات -5`- triphos phate و3`- OH. إن النهايات 5`- triphosphate يجرى لها تحوير لتصبح 5`- OH وذلك عن طريق تحضين حوالى ١٠٠ نانوغرام من RNA مع وحدة واحدة من

أنزيم RNase Calf intentinal phosphatase يتبع ذلك الاستخلاص بالفينول ثم الترسيب بالايثانول. لقد أنتجت نهايات 5`- Monophosphate باستعمال نسخ مستقيمة مزالة عنها الفسفرة و ATP غير مشبعة وأنزيم Polynucleotide Kinase. يستعمل تفاعل متوازى مع $[\gamma P^{32}]$ - ATP لدمج Monitor phosphate. أما بالنسبة للتحليق فإن RNA المعامل بالكينيز يسخن على درجة ٦٥°م لمدة ١٠ دقائق لتثبيط الكاينيز ثم بعد ذلك يحضن مع T_4 RNA ligase.

٥ - تحديد التتابع فى نقط إتصال الربط فى الطبيعة:

Determination of The Sequence of The In Vivo Ligation Junction.

تعزل الفيرويدات الذرية (Progeny) من نسيج مصاب بنسخة مستقيمة من CEVd أنتجت باستعمال البوادئ P_1 و P_2 (CEVd - T_1) كما ذكر سابقاً وأجرى لها إكثار بواسطة النسخ العكسى / PCR باستعمال P_5 و P_6 وتركيبهما كالآتى.

[dCGAAAGGAAGGAGACGAGCTCCTG] = P_5

[dCTGCTGGCTCCACATCCGA] = P_6 تكون مرتبطة مع نيوكليتيدات ١٧٥ إلى ١٩٨، ونيوكليتيدات ١٩٩ إلى ٢١٧ من CEVd بالترتيب شكل ٢٩. إن ال DNA الذى حصل له إكثار أجرى له عملية تنقية بالهجرة الكهربائية فى أجروس ذو نقطة ذوبان منخفضة وحصل له تسلسل مباشرة بواسطة T_7 DNA polymerase (Bachmann et al سنة ١٩٩٠).

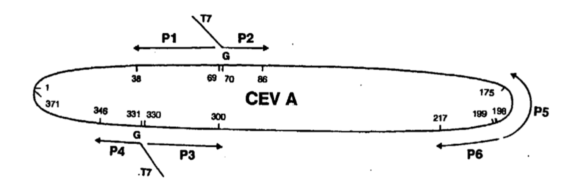
النتائج Results :

١ - توضيح لبناء الفيرويدات فى المعمل:

Scheme For The In Vitro Synthesis of Viroids

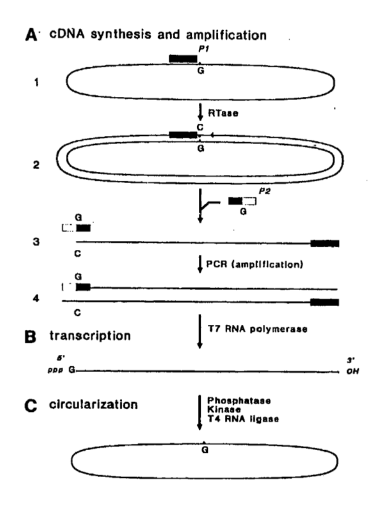
الخيط الأول البادئ Oligo deoxy ribonucleotide (شكل ٣٠ P_1) يختار من أى منطقة من الفيرويد5` إلى آخر قاعدة G ويعاد إتحاده إلى RNA الفيرويدى. يؤدى النسخ العكسى إلى طول كامل من cDNA يحتوى نهايات3` فى C. الخيط

البادئ الثانى (شكل ٣٠، P_2) يحتوى علـى ال ١٨ نيوكليتيدة من T_7 يحفز البنــاء فى مواقع بدء العمل وترتبط مـع تتابع حوالـى ١٥ نيوكليتيدة مكملة لنهاية `3 من ال c DNA. النهاية G فى موقع ١٨ فى $P_2$ تشبك أو تربط القطعتين وتكون مكملة إلى C -`3 من الخيط الأول من DNA. بناء الخيط الثانى وإكثار ال DNA يتحصل عليه بواسطة طريقة PCR. إن ds DNA المتحصل عليه يحتوى على محفز كامل من T_7 RNA polymerase وتشفر لتتابع الفيرويد بالطول المضبوط. يتم نسخ ال DNA بواسطة T_7 RNA polymerase وينتج فيرويد مستقيم كامل الطول. إن RNA المستقيم يمكن أن يتحلق بواسطة أنزيم الربط RNA ligase بعد أن يحدث تحورات فى `5 - triphosphate إلى Monophosphate.



شكل رقم ٢٩ :

مواقع برايمرز متخصصة تستعمل فى تفاعل cDNA / PCR وتتابع ذرية CEVd. برايمر P_1، P_3 و P_5 متكاملة ذات معنى أما برايمـر P_2 ، P_4 و P_6 كانت ذات معنى مع الفيرويد. برايمر P_2 و P_4 تحتوى بروموتر بولى ميريز T_7 RNA. أما برايمر P_5 و P_6 كانت تستعمل للإكثار وتتابع ذرية RNA الفيرويدى. رؤوس الأسهم تشير إلى إتجاه البناء.



شكل رقم ٣٠ :

شكل تخطيطى لبناء الفيرويدات فى المعمل. (A) بناء cDNA يجرى عن طريق إعادة الاتحاد مع برايمر P_1 بقالب الفيرويد الدائرى (خطوة ١) يتبع ذلك نسخ عكسى مؤدياً إلى جزئ منتهياً بنهاية C (خطوة ٢). أما البرايمر P_2، خطوة (٣) يحتوى مشجع T_7 ويستعمل للإكثار فى تفاعل PCR (خطوة٤). النسخ B والتحليق C مشروحة فى الكتاب.

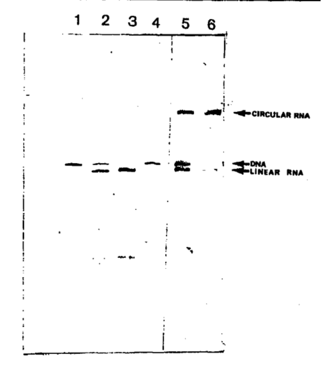
٢ ـ بناء الأشكال المستقيمة والدائرية من فيرويد اكسوكورتز الحمضيات:

Synthesis of Linear and Circular Forms of CEVd

لقد تم بناء فيرويد اكسوكورتز الحمضيات فى المعمل وظهرت بوضوح نشاطاته الحيوية فى تجارب على النبات العائل. إن الفيرويد CEVd -A هو خيط مزدوج من cDNA مندمج مع المحفز T_7 قد أنتج (شكل ٣١ شريحة ١) بواسطة عملية النسخ العكسى / PCR وإجراءات استعمل فيها البوادئ P_1 وP_2 شكل ٢٩ . إنds DNA قد عومل بأنزيم Ribonuclease لاستبعاد أى بقايا. يستعمل CEVd بشكل أساسى كقالب وبعد التنقية ينسخ بواسطة T_7 RNA Polymerase لانتاج منتج من RNA وحيد الخيط مساوياً لجزئ مستقيم من CEVd - A بنهايات تصل حتى رقم ٦٩ و ٧٠ (شكل ٣١ شريحة ٢، CEVd - T_1). إن هوية نسخة من- CEVd T_1 قد تأكدت بواسطة الهضم بأنزيمات DNase وRNase (شكل ٣١ شريحة ٣ و٤). يتبع ذلك الهجرة الكهربائية تحت ظروف الدنترة، إن نسخة من CEVd - T_1 لها نفس القابلية للتحرك والانتقال كما فى CEVd - A المستقيم ذو العدد ٣٧١ نيوكليتيدة (شكل ٣١ شريحة ٣، ٦) موجود فى تحضير منقى من الفيرويد من نباتات مصابة.

النسخ الدائرية المقفولة التكافؤية قد أنتجت من CEVd T_1 RNA المستقيم المتحصل عليه ثم يتبع بعد ذلك إنقلاب للنهاية 5`- triphosphate إلى مونوفوسفيت عن طريق المعاملة أولاً بأنزيم الفسفاتيز ثم بعد ذلك بأنزيمPolynucleotide Kinase بعد التحضين مع T_4 RNA ligase فإن نسبة من النسخ المستقيمة كانت قد تحلقت وكانت متساوية فى الحركة مع CEVd - A (شكل ٣١ شريحة ٥، ٦).

إن البوادئ P_3 وP_4 شكل ٢٩ كانت قد استعملت فى تفاعل موازى لانتاج أنواع أخرى من CEVd المستقيم بنهايات على ٣٣٠ و ٣٣١. هذه النسخة الثانية كانت قد استعملت لإختبار إمكانية الانتاج لهذا التكنيك ولفحص النسخ المبتدأة من مواضع مختلفة على جزئ CEVd الدائرى فيما إذا كانت معدية (حيوية).



شكل رقم ٣١:

بناء أشكال الفيرويد CEVd المستقيمة والدائرية. الشريحة ١ = ناتجة عن طريقة التكبير بواسطة PCR للحمض cDNA الفيرويدى CEVd يحتوى مشجع T_7، أما شريحة ٢ = ناتجة عن إكثار DNA و RNA المستقيم بعد النسخ. شريحـة ٣ = ناتجات النسخ معاملة بـ DNase. أما شريحة ٤ = ناتجات نسخ معاملة بأنزيم RNase. شريحة ٥ = ناتجات إزالة الفسفات. نسخ Kinased الناتجات معاملة T_4، RNA ligase، شريحة ٦ = CEVd - A مأخوذ ثانية من النباتات المصابة. النسخ الصغيرة تكون غالباً نتيجة نهايات غير ناضجة.

٣ ـ حيوية فيرويد اكسوكورتز الحمضيات المصنع فى المعمل:

Infectivity of In Vitro Synthesized CENd

بعد حقن نباتات الطماطم بحوالى ٣٠ نانوغرام / ميكولتر من كلا النوعين (نسخة مستقيمة) CEVd - T_2 و CEVd - T_1 ، فقد أظهرت تشوه كبير فى ساق النبات وتقزم يدل على الإصابة بالفيرويد CEVd - A خلال ثلاثة أسابيع من الحقن (جدول ١٦). لم تتأثر الحيوية بمعاملة مخلوط النسخ بأنزيم DNase ولكن تبطل الحيوية بالمعاملة بأنزيم RNase. إن نباتات الطماطم التى حقنت بكمية أكبر

من ميكوغرام / ميكولتر من قالب CEVd DNAs لم يظهر عليها أية أعراض، هذا يدل على أن الحيوية كانت بسبب النسخة الكاملة لـ RNA.

أعيد اكتشاف ذرية الفيرويد من نباتات الطماطم المحقونة بنسخة CEVd - T_1 وأثبت أنها دائرية بواسطة الهجرة الكهربائية فى الجيل ثنائى الاتجاه. إن تحليل التتابع لذرية الفيرويد أثبت أنها كانت مماثلة للفيرويد الأصلى فى منطقة إتصال الربط فى تجارب المعمل.

جدول رقم ١٦: حيوية فيرويد اكسوكورتز الحمضيات المبنى فى المعمل:

اللقاح	الحمض النووى الأولى والتركيز		الحيويــة					
	DNA	RNA	10^{0}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
CEVd - T_1 PCR DNA	1000	—	0/6					
CEVd - T_2 PCR DNA	1000	—	0/6					
Untreated - CEVd - T_1	1	30	6/6					
DNase + Transcription	0	30	6/6					
RNase + Mixture	1	0	0/6					
Untreated - CEVD - T_2	1	30	6/6					
DNase + Transcription	0	30	6/6					
RNase + Mixture	1	0	0/6					
5`- Endmodified Triphosphate	0	30	6/6	3/6	0/6	0/6	0/6	0/6
CEVd - T_1 RNA Monophosphate	0	30	6/6	4/6	1/6	0/6	0/6	0/6
Transcript Hydroxyl	0	30	5/6	4/6	0/6	0/6	0/6	0/6
CEVd - A	—	30	N.T	6/6	6/6	5/6	2/6	0/6
T_E buffer	—	—	0/6					

ملاحظات:-

التركيز نانوغرام / ميكولتر. N.T= لم تختبر. الحيوية = عدد النباتات التى تظهر أعراض / عدد النباتات المحقونة.

٤ - تأثير تحوير النهاية الطرفية خمسة فتحة على حيوية النسخة المستقيمة :

Effect of 5` - terminal modification on Linear Transcript Infectivity

أن تأثير التحور فى النهاية الطرفية `5 على حيوية نسخة $CEVd - T_1$ إختبرت بواسطة إنتاج نسخ تحتوى نهايات OH -`3 مرتبطة مع 5`- triphosphate أو monophosphate أو مجموعة OH - وأنجزت إختبارات الحيوية بواسطة سلسلة تخفيفات.

التركيز الأولى للنسخ والفيرويد ١٠° استعملت لدراسة الحيوية كانت ٣٠ نانوغرام لكل ميكولتر وتخفيفات حضرت لغاية ١٠^{-٥}. حقنت النباتات بتركيز ١ ميكولتر من اللقاح لكل فلقة وتركت لتنمو ثم أخذت عنها الملاحظات.

وجد أن CEVd - A الدائرى النوع الأصلى له نقطة تخفيف قصوى للاحتفاظ بحيويتـه وكفاءتـه هى ١٠^{-٥}. وعلى أية حال فإن النسـخ المستقيمة كانـت فعلاً أقـل حيويـة حيث تبدى نقطة تخفيـف ١٠^{-٣} لـ RNA المستقيم المحتـوى 5`- monophosphate و ١٠<sup>-٢</sup> لـ RNAs المستقيمة التى تحتوى 5`- triphosphate أو OH -`5 (جدول ١٦).

مناقشة النتائج

فى البحوث المذكورة سابقاً ذكر أنه تم بناء نسخاً معدية مستقيمة مختلفة لها الطول الكامل ومتوافقة مع CEVd (الحمض RNA)، كل من هذه النسخ تسبب أعراض مرضية فى نباتات الطماطم نموذجية للعزلة الشديدة من CEVd وتؤدى إلى إنتاج ذرية CEVd دائرية تشبه الطراز الأصلى. إن الدراسات السابقة للأشكال المستقيمة من الفيرويدات قد استعملت الفيرويدات المستقيمة التى نتجت إما بالحدوث الطبيعى لجزئ مستقيم عزل من نسيج مصاب أو RNA فيرويدى دائرى حدث له استقامة بواسطة فعل أنزيمات Nucleases أو أيونات Mg^{2+}. إن التحضير لهذا النوع يمكن أن يحصل له تلوث بواسطة RNA الدائرى ويصبح محتوياً على

خليط غير متجانس من جزيئات غير مستقيمة أنتجت بواسطة احداث الثغرة أو الفتح Nicking (إحداث فتحة صغيرة فى خيط الحمض النووى) على مواقع مختلفة فى الجزئ الدائرى وبالتالى يصعب تفسير نتائج الإختبارات الحيوية.

إن الطريقة المذكورة فى هذا البحث تتغلب على هذه المشاكل وتؤدى إلى إنتاج تحضيرات متجانسة من جزيئات فيرويد مستقيمة مساوية لتلك المنتجة بواسطة طريقة الثغرة المفردة على مواضع متخصصة خالية من التلوث بـ RNA الدائرى. هذه الجزيئات تكون مناسبة جداً (مثالية) لدراسة حيوية الفيرويدات المستقيمة وتأثيرات تحورات النهايات الطرفية على حيوية الفيرويد المستقيم.

إن الأشكال المستقيمة الحادثة طبيعياً للفيرويدات تتجمع فى النسيج المصاب، من المحتمل أن تكون كوسيطات تظهر فى نموذج التكاثر (النسخ) بطريقة الدائرة الملتفة. بغض النظر عن الأبحاث السابقة، فإن جميع الدراسات قد أظهرت أن هذه الجزيئات المستقيمة الحادثة طبيعياً أنها معدية. إن الأشكال المستقيمة التى تحدث طبيعياً لفيرويد تقزم الأقحوان وفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس هى معدية مثلها مثل الأشكال الدائرية الخاصة. بينما الشكل المستقيم لفيرويد تقزم الأقحوان قد ذكر بأنه ناتجاً عن الانشطار العشوائى، وأن فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس يبدو بأنه ناتج بواسطة الانشطار الذى يحدث فى بضع مواقع خاصة. إن هذه الجزيئات المستقيمة لفيرويد PSTVd قد وصفت وذكر لها مميزات أكثر وتبين بأنها تحتوى نهايات طرفية 5`- OH و 2`, 3`- cyclic phosphate. إن التجمعات غير المتجانسة من جزيئات فيرويد PSTVd التى أحدثت فيها ثغرة صناعية (nicked) المنتجة باستعمال Nucleases و $U_2$ و Cl والتى أيضاً تحتوى نهايات طرفية 5`- OH و 2`, 3`- cyclic phosphate ، قد تبين أيضاً أنها تظهر حيوية كاملة، بينما الجزيئات المشابهة والتى تحتوى نهاية 3`- OH و 5`- phosphate المنتجة بواسطة الثغرة مع S1 nuclease فإنها تعتبر غير معدية. هذه البيانات تقترح بأن حلقة 2`, 3`- cyclic phosphate هى خطوة أولية أساسية للحيوية (العدوى). وعلى أية حال فإن نتائج

هذا البحث على فيرويد اكسوكورتز الحمضيات لم تدعم هذه الفكرة (النظرية) بسبب أن النسخ المستعملة فى هذه الدراسة كلها تحتوى OH -`3 وكانت معدية ولو على كميات صغيرة بالمقارنة مع الفيرويد الدائرى.

جزيئات فيرويد PSTVd والتى أجرى لها عملية الثغرة صناعياً nicked باستعمال Mg^{2+} لانتاج أشكال مستقيمة مع مخلوط من نهايات -`2 و-`3 - phos-phate مقترنة مع OH -`5 أظهرت بأنها ذات حيوية خاصة منخفضة بأضعاف ١٠^٣ ـ ١٠^٤ أو ١٠^٢ أقل منه فى الفيرويد الدائرى مشابهة بذلك لحيوية الجزيئات المستقيمة المذكورة هنا. يبدو من المحتمل أن أطراف 2`- 3`Cyclic Phosphate يجب أن تكون موجودة فى ال RNA المستقيم ليظهر حيوية كاملة، ولأن الجزيئات تحتوى مجموعات أخرى على 3`- terminus دائماً يبدو بأنها تظهر مستوى منخفض من الحيوية. إن التحوير أو التعديل فى ال 5`- End يظهر بأن له قليلاً أو بدون تأثير على حيوية النسخ المستقيمة عند مقارنته بالفيرويد الدائرى.

هناك نوع جديد ذو حيوية من RNA ligase فى مستخلصات جنين القمح والذى يتطلب أطراف 2`, 3`- cyclic phosphate وأيضاً إما -`5 5`- phos-phate أو OH -`5 قد تم وصفه ولقد استخدم فى المعمل مثل Viroid ligase. ولقد تبين أن نسخ CEVd المستقيمة والتى لا تحتوى النهاية الطرفية2`, 3`- cyclic phosphate كانت معدية وهذا يؤدى إلى الاعتقاد بأنه إما النوع الثانى من ال ligase يكون موجوداً فى العائل النباتى أو أن 3`- terminus تخضع لعملية الفسفرة فى الطبيعة In Vivo Phosphorylation لانتاج 2`, 3`- cyclic phosphate والتى يمكن فيما بعد أن تعمل كمادة تفاعل لأنزيم ال Ligase الموصوف سابقاً.

المخطط الثانى يبدو أنه أكثر احتمالاً، ولأن مستخلصات جنين القمح لم تظهر نشاطاً يمكن اكتشافه لأنزيم ال Ligase عندما يحضن مع جزيئات فيرويد مستقيم

أنتجت بواسطة S1 nuclease والذى يمتلك نهاية طرفية OH -`3 و 5`- phosphate مشابهة لواحدة من النسخ التى أظهرت أنها معدية فى هذه الدراسة.

إن الفيرويدات لم تظهر أى تشفير للبروتينات وتبقى عملية إحداث الطفرات Mutagenesis أكبر طريقة لتحليل وظائف تركيبها. وعلى أية حال فإن دراسة إحداث الطفرات قد تبين بأنها محدودة بسبب الحاجة إلى بناء كلونات DNA معدية فى الشكل head - to - tail dimers وأيضاً بسبب الحاجة لبناء أعداداً كبيرة من الطافرات mutants من التى معظمها يكون غير قابل للحياة. إن نظام بناء ال RNA المذكور فى البحث السابق يتجنب الحاجة إلى كلونة وهو مناسب بشكل خاص لسرعة إحداث الطفرات الموجهة لمواقع معينة-Rapid site - di rected mutagenesis فى ال RNA الدائرى بسبب بادئ Oligonucleotide محتوياً طفرات يمكن أن تختار من أى منطقة فى جزئ `5 إلى نهاية موقع G. فمثلاً بالإضافة إلى الفيرويدات فإن الفيروسايدات و Hepatitis delta virus RNA وخمائر20 S RNA replicon يمكن أن تبنى بواسطة هذا النظام. إن أنظمة بناء RNA داخلاً فى بوادئ Oligonucleotide محتوية أنزيم RNA polymerase المعتمد على DNA محفزاً للتتابع قد استعمل قبل ذلك لتكاثر RNA من قالب DNA مكلون أو لإنتاج RNA فيروسى معدى محتوياً إضافة لذلك نيوكليتيدات 3`- termind من PCR DNA مكلون. كذلك فإن النظام المذكور هنا فإنه لا يتدخل فى إجراءات كلونة ويؤهل البناء فى المعمل للحجم المضبوط لـ RNAs ليس فقط من قوالب RNA الدائرى ولكن أيضاً من RNAs المستقيم المحتوى5`- terminal G residue. كذلك فإن mRNAs ويمكن أيضاً RNAs الفيروسى أن تصنف فى هذا المخطط، وهذا التكنيك يرتبط مع إجراء غطاء RNA لإنتاج RNAs فيروسى نشيط بيولوجياً، بدون شك سوف يستخدم فى الدراسات على مثل هذه الجزيئات.

ثانياً: ـ المعالجة بالحرارة المنخفضة ومزرعة القمة المرستيمية لاستبعاد أربعة فيرويدات من النباتات المصابة:

A Low Tepmerature Therapy and Meristem - Tip Culture For Eliminating Four Viroids From Infected Plants

مقدمة:

إن الجمع بين المعالجة الحرارية ومزارع القمة المرستيمية قد استعمل منذ مدة طويلة كطريقة للتخلص من الفيروسات من النباتات المصابة، ولكن ثبت بأنها غير فعالة إلى حد ما فى التخلص من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس والتخلص من فيرويد تقزم الأقحوان من النباتات المصابة بالفيرويد فى البطاطس والأقحوان. هذا لا يثير الدهشة إذا علمنا جيداً أن الفيرويدات تخترق الخلايا المرستيمية بسهولة أكثر من الفيروسات وأن درجات الحرارة العالية تناسب تناسخ الفيرويد. عندئذ فإن المحاولات لاستبعاد الفيرويدات من النباتات المصابة عن طريق المعالجة بالحرارة المنخفضة مرتبطة مع مزارع القمة المرستيمية يبدو أنها ممكنة. وفى الحقيقة أمكن الحصول على نباتات بطاطس خالية من فيرويد الدرنة المغزلية وكذلك نباتات حشيشة الدينار (HOP) خالية من فيرويد تقزم حشيشة الدينار قد تم بناء على استعمال هذه الطريقة:

تؤخذ نباتات بطاطس الصنف المزروع Prosna من عقل ساق أو درنات ثم تحقن بسلالات شديدة من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس (s - PSTVd)، بالإضافة إلى نباتات الأقحوان الصنف المزروع Bonnie Jean المصابة بفيرويد تقزم الأقحوان CSVd والصنف المزروع Deep Ridge المصاب بفيرويد التبرقش الشاحب فى الاقحوان ChCMVd والصنف المزروع Mistletoe المصاب بفيرويد الثمرة الباهتة

ملاحظة: قام بهذا البحث إثنان من العلماء فى وارسو (بولندا) والذى أمدنى بالبحث الدكتورة- E. Paduch .Cichal

فى الخيار CPFVd وتنمى فى مراقد نمو على درجة حرارة ٥ْم وإضاءة ١٦ ساعة يومياً مع كثافة ضوئية 5.0001X . أما نباتات الكنترول من نفس الأنواع والأصناف المزروعة والتى أصيبت بنفس الفيرويد نميت فى صوبا زجاجية تحت ظروف نمو قياسية.

درنات بطاطس من الصنف Azalia والصنف Irys المصابة بالسلالة الشديدة من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس s - PSTVd أو السلالة المعتدلة m - PSTVd تحفظ فى ثلاجة على درجة حرارة ٦ ـ ٧ْم. أما الدرنات الكنترول من نفس الأصناف والتى أصيبت بنفس الفيرويدات حفظت على درجة حرارة الغرفة العادية.

بعد ٣ و ٦ شهور تقطع القمم المرستيمية من السيقان أو نموات الدرنة من النباتات المعاملة والكنترول. تطهر سطوح المواد النباتية عن طريق غمرها فى ٩٦٪ إيثانول لمدة ٣٠ ثانية ثم تشطف بماء معقم. قطعت القمم المستيمية (قبة المرستيم مع واحدة أو إثنتين لفة إبتدائية) فى ظروف معقمة بنصل حاد معقم. نقلت القمم المقطوعة على ورق ترشيح يعمل كموصل إلى أنابيب إختبار بايركس (١ سم قطر و ٧ سم طول) وضع فيها ٤ مللتر محلول بيئة يسمى بيئةMurashinge & Skoog (هذه البيئة ذكرها كل من Mellor & Smith سنة ١٩٧٧) والتى كانت قد عقمت مسبقاً لمدة ٣٠ دقيقة فى الاوتوغليف على ضغط جوى واحد. تغلق أنابيب الإختبار بغطاءات قطنية من نوع صوفى وبقطع من Parafilm وحفظت على دجة حرارة ١٦ ـ ٢٠ْم و ١٤ ساعة إضاءة يومياً وكثافة ضوئية 2.0001X .

عندما أصبح طول النباتات النامية من الدرنات بطول ٣سم وعندما تكون لها نظام جذرى جيد نقلت إلى أوعية بلاستيكية صغيرة مملوءة بمخلوط (٢:١)- Peat mossورمل. بعد ١٠ ـ ١٤ يوم أخرى نقلت إلى أوعية بلاستيكية مملوءة بمواد مناسبة للنمو ثم تركت لتنمو تحت ظروف الصوبا الزجاجية المثالية.

إختبر وجود الفيرويد فى النبات بعد ٢، ٤ و٦ شهور من النمو فى الصوبا الزجاجية. النباتات المفردة إختبرت بواسطة الهجرة الكهربائية فى Polyacrylamide gel وبواسطة الإختبارات الحيوية. نباتات الطماطم صنف Rutgers استعملت ككاشف لكل من PSTVd السلالة الشديدة والمعتدلة، نباتات الأقحوان الصنف المزروع Deep Ridge كاشف لـ ChCMVd ونباتات الأقحوان الصنف المزروع Bonnie Jean كاشف لكل من CSVd و CPFVd. هذه الأصناف ثبت وأنها نباتات كاشفة جيدة للفيرويدات فى تجارب سابقة.

النتائج:-

نباتات الأقحوان تحملت ظروف درجات الحرارة المنخفضة والكثافة الضوئية المنخفضة بصفة أحسن من نباتات البطاطس جدول ١٧. كانت أقل درجة تحمل لنباتات البطاطس هى النامية من الدرنات. فقط نبات مفرد واحد من ٢٠ نبات بقيت حية لمدة ٣ شهور تحت هذه الظروف وحتى هذا النبات المفرد مات قبل نهاية الستة شهور مدة المعالجة. أما نباتات البطاطس النامية من عقل ساق بقيت حية لمدة أطول نوعا ما وأربعة نباتات منها بقيت حية حتى نهاية الستة شهور مدة المعالجة. ومن ناحية أخرى فإن درنات البطاطس بقيت حية بصورة جيدة فى ظروف المعالجة والتى كانت غالباً مثل الظروف المثالية لتخزين البطاطس جدول ١٧.

أما بالنسبة للقمم المرستيمية، تقريباً فإن نصفها قد نمى إلى نباتات ولا يوجد مشكلة فيما إذا كانت قد قطعت من نباتات الأقحوان أو البطاطس (جدول ١٧). لم يلاحظ أى تأثير لظروف المعالجة على بقاء المرستيمات حية. إن العدد الحقيقى للقمم المرستيمية التى بقيت حية يختلف من ٢٥ ـ ٩٠٪ للنباتات المختلفة ولكن يبدو أنها لم تتأثر بنوع النبات ولا بظروف المعالجة جدول ١٧.

إن الأعراض النموذجية للإصابة بالفيرويدات ChMVd، CSVd وCPFVd كانت ملاحظة على نباتات الأقحوان النامية من قمم مرستيمية أخذت من نباتات

الكنترول الجاهزة فى الشهر الأول من نموها فى الصوبا الزجاجية. نباتات البطاطس النامية من قمم مرستيمية المأخوذة من مثل هذه النباتات أظهرت أعراض PSTVd بعد ٢ أو ٣ شهور من نموها فى الصوبا الزجاجية. جميع الفيرويدات الأربعة اكتشفت فى هذه النباتات بواسطة الاختبارات الحيوية أو بواسطة إختبار الهجرة الكهربائية فى Polyacrylamide gel.

ولسوء الحظ فإن الأربعة فيرويدات كلها اكتشفت أيضاً فى جميع النباتات النامية من القمم المرستيمية المأخوذة من النباتات التى قد نمت لمدة ٣ شهور فى ظروف المعالجة. الفيرويدات اكتشفت فى هذه النباتات بعد شهرين من النمو فى الصوبا الزجاجية (جدول ١٨) وبعد شهر أو شهرين جميع هذه النباتات أظهرت أعراض.

ومن ناحية أخرى ولا أى نبات من النباتات النامية من قمم مرستيمية المأخوذة من النباتات التى قد نمت لمدة ٦ شهور فى ظروف درجات حرارة منخفضة لم تظهر أعراض إطلاقاً للإصابة الفيرويدية خلال ستة شهور من النمو فى الصوبا الزجاجية. إن الإختبارات الحيوية وإختبارات الهجرة الكهربائية فىPolyacrylamide gel قد أثبتت أنه بعد شهرين من النمو فى الصوبا الزجاجية فإن أعداداً كبيرة من هذه النباتات كانت خالية من الفيرويدات. إعادة الاختبار لهذه النباتات بعد ٤ و٦ شهور من النمو فى الصوبا الزجاجية أظهرت الوجود للفيرويدات فى بعضها ولكن لا تزال ١٨,٥ ـ ٨٠٪ من هذه النباتات خالية من الفيرويد جدول ١٨ .

الدرنات من نباتات البطاطس والعقل من نباتات الأقحوان التى ظهرت بأنها خالية من الفيرويد بعد ٦ شهور نمو فى الصوبا الزجاجية قد نُميّت إلى نباتات وهذه النباتات أختبرت ثانية لمعرفة وجود الفيرويدات فأعطت نتائج سالبة.

جدول ١٧: حصر لنباتات البطاطس والدرنات ونباتات الأقحوان فى درجات الحرارة المنخفضة ٥°م وحصر للنباتات الناتجة من القمم المرستيمية لهذه النباتات.

	الأجزاء النباتية والفيرويد	المعاملة	عدد النباتات (درنات)			عدد المرستيمات المقطوعة من النباتات (درنات) بعد المعالجة		عدد النباتات النامية من المرستيمات المقطوعة بعد المعالجة	
			معاملة	قاومت المعالجة لمدة ٣ شهور	٦ شهور	٣ شهور	٦ شهور	٣ شهور	٦ شهور
أ ـ	بطاطس نوع Prosna ـ نباتات								
١ ـ	نامية من درنات	معالجة	٢٠	١	صفر	٣	ـ	٢	ـ
٢ ـ	s - PSTVd	كنترول	٢٠	ـ	ـ	٤٠	ـ	١٠	ـ
ب ـ	بطاطس نوع Prosna نباتات								
١ ـ	نامية من عقل	معالجة	٢٠	٤	٤	١٢	١٢	٥	١١
٢ ـ	s - PSTVd	كنترول	٢٠	ـ	ـ	٣٠	٣٠	١٥	١٠
جـ ـ	بطاطس نوع أزاليا ـ درنات	معالجة	٤	٤	٤	١٠	٨	٥	٤
	s PSTVd	كنترول	٥	ـ	ـ	١٠	١٢	٨	٧
د ـ	بطاطس نوع أيرس درنات	معالجة	١٢	١٢	١٢	٢٤	١٨	١٠	٧
	s PSTVd	كنترول	١٢	ـ	ـ	٢٤	٢٤	١٢	١٠
هـ ـ	بطاطس نوع ازاليا درنات	معالجة	١٢	١٢	١٢	٢٤	٢٠	١٢	١٠
	m PSTVd	كنترول	١٢	ـ	ـ	٢٤	٢٤	١٠	١٦
و ـ	بطاطس نوع أيرس درنات	معالجة	١٢	١٢	١٢	٢٠	٢٠	١٠	٨
	m PSTVd	كنترول	١٢	ـ	ـ	٢٤	٢٤	١١	١٠
ز ـ	أقحوان نوع ديب رادج	معالجة	١٩	١٩	١٩	٥٧	٥٧	٢٨	٣٧
	ChCMVd	كنترول	١٩	ـ	ـ	٤٥	٥٠	١٩	٣٥
ح ـ	أقحوان نوع بون جين	معالجة	٢٥	٢٥	٢٥	٧٥	٧٥	٣٢	٢٧
	CSVd	كنترول	٢٥	ـ	ـ	٦٠	٦٥	٢٠	٣٠
ط ـ	أقحوان صنف مستيليتو	معالجة	١٠	١٠	١٠	٣٠	٣٠	١٠	١٠
	CPFVd	كنترول	١٠	ـ	ـ	٢٥	٣٠	١٥	٢٥

جدول ١٨ : كفاءة استبعاد أربعة فيرويدات من نباتات البطاطس والأقحوان باستعمال مزرعة القمة المرستيمية بعد المعالجة بالحرارة المنخفضة.

المادة النباتية والفيرويد	مدة المعالجة بالأشهر	عدد النباتات النامية من المرستيم المقطوع	عدد النباتات الخالية من الفيرويد إعتماداً على الاختبار بعد فترة نمو فى الصويا الزجاجية ٢ شهر	٤ شهور	٦ شهور
بطاطس ـ نباتات الصنف بروسنا	كنترول	٢٥	صفر	—	—
نباتات بطاطس نامية من الساق	٣	٥	صفر	—	—
نباتات بطاطس نامية من عقل	٦	١١	٩	٨	٦
المعاملة بالفيرويد s - PSTVd					
بطاطس ـ صنف بروسنا نباتات	كنترول	١٥	صفر	—	—
بطاطس صنف ازالا ـ درنات	٣	٥	صفر	—	—
s - PSTVd	٦	٤	٢	٢	١
بطاطس مزروعة صنف أيرس	كنترول	٢٢	صفر	—	—
بطاطس درنات	٣	١٠	صفر	—	—
s PSTVd	٦	٧	٥	٣	٢
بطاطس مزروعة صنف بروسنا	كنترول	٢٦	صفر	—	—
درنات صنف ازالا	٣	١٢	صفر	—	—
m PSTVd	٦	١٠	٧	٦	٥
بطاطس مزروعة صنف أيرس	كنترول	٢١	صفر	—	—
بطاطس درنات	٣	١٠	صفر	—	—
m PSTVd	٦	٨	٦	٥	٤
الأقحوان	كنترول	٥٤	صفر	—	—
أقحوان صنف ديب راجد	٣	٢٨	صفر	—	—
فيرويد ChCMVd	٦	٣٧	٣١	٢٩	٢٦
أقحوان	كنترول	٥٠	صفر	—	—
أقحوان صنف بون جين	٣	٣٢	صفر	—	—
CSVd	٦	٢٧	١٥	٥	٥
أقحوان	كنترول	٤٠	صفر	—	—
أقحوان صنف مستلوت	٣	١٠	صفر	—	—
CPFVd	٦	١٠	٩	٩	٨

ثالثاً: - تثبيط إصابة الفيرويد بواسطة تعبيرات RNA مضاد المعنى فى النباتات المحولة وراثياً:

Inhibition of Viroid Infection by Antisense RNA Expression in Transgenic Plants

مقدمة : -

تعتمد هذه الطريقة على بناء جزيئات من RNA متكاملة مع mRNA الناتج من نسخ جين معين، ويطلق على هذا الأخير اسم Sense RNA (ذو معنى) نظراً لأنه يحمل الكودونات التى تتم قراءتها أثناء عملية الترجمة لانتاج بروتين فعال يحتوى على تتابع نوعى من الأحماض الأمينية. ومن جهة أخرى يطلق على النسخة المكملة من RNA إسم مضاد المعنى "Anti Sense" نظراً لأن تتابع النيوكليتيدات بها يكون معكوساً بالنسبة للتتابع على النسخة الأصلية مما يترتب عليه عدم إمكان قراءة كودونات شفرية صحيحة وذات معنى بل تقرأ على أنها كودونات إنهاء الترجمة فى أى إطار قراءة من الإطارات الثلاثة.

يؤدى توافر RNA مضاد المعنى مع mRNA المراسل الطبيعى لنفس الجين فى سيتوسول الخلية إلى حدوث تجاذب نوعى بينهما بحيث ينتج جزئ مزدوج هجين من RNA، وبديهى أنه لا يمكن ترجمة مثل هذا الجزئ المزدوج مما يعنى عدم الحصول على الناتج النهائى لتعبير هذا الجين (البروتين) وبالتالى يكون بمقدورنا تحديد وظيفة هذا الجين.

وتتلخص طريقة إنتاج RNA مضاد المعنى لجين ما فى الخلية فى الآتى: -

---

ملاحظة: قام بهذا البحث أحد عشر عالماً فى مركز أبحاث البيولوجيا الجزيئية فى ألمانيا والذى أمدنى بهذه المعلومات مشكوراً هو الدكتور Detldv Riesner وأنا أعرضه بشكل مختصر.

١ ـ كلونة الجين المطلوب دراسته.

٢ ـ فصل التتابع الشفرى للجين عن منطقة البروموتور الخاص به باستخدام أنزيمات القطع المحددة المناسبة.

٣ إعادة إتحاد التتابع الشفرى للجين مع نفس البروموتور ولكن فى إتجاه معكوس التتابع.

٤ ـ إعادة إدخال هذا التتابع المعكوس المتحد بالبروموتور. أى الجين المضاد المعنى إلى الخلية المضيفة بإحدى طرق التحول الوراثى.

تكون المحصلة النهائية لهذه العملية هى أن الجين المعكوس التتابع سيتم نسخه إلى نسخ RNA مضاد المعنى، وهـذه بدورها عـند اصطـدامها بالنسخ الطبيعية لـ m RNA لنفس الجين (ذو المعنـى) تتزاوج معها مكـونة جزئ RNA مزدوج لا يمكن ترجمته مما يؤدى إلى توقف إنتاج البروتين الذى يشفر له هذا الجين.

لقد تم إستخدام RNA مضاد المعنى فى إيقاف تعبير عدد كبير من الجينات فى كل من غير مميزة النواة ومميزة النواة. بالإضافة إلى إستخدامه فى إيقاف تعبير الجينات معروفة الوظيفة فإنه يمكن استخدامه أيضاً فى التعرف على وظيفة الجينات المجهولة الوظيفة. إذ يمكن استخدام RNA مضاد المعنى فى إنتاج طفرات وظيفية بحيث يعطى الشكل المظهرى الطافر للكائن الذى حدثت به هذه العملية ومعلومات هامة عن وظيفة الجين فى الخلية المتأثرة.

ولكى نضمن الحصول على إيقاف تام للتعبير الجينى فإنه إما أن يستخدم بروموتور قوى جداً لدفع عملية نسخ التتابع الشفرى المعكوس أو أن يتم ادخال عدد كبير من نسخ RNA مضاد المعنى إلى الخلية المضيفة.

(هذه المقدمة أخذت من كتاب البيولوجيا الجزيئية للدكتور محمد فتحى عبد الوهاب سنة ١٩٩٣).

استعمال RNA مضاد المعنى مع الفيرويدات:

معظم التطبيقات التى أجريت باستعمال RNA مضاد المعنى والموجهة مباشرة ضد الجينوم الفيروسى أظهرت نجاحاً محدوداً. هناك تعبيرات أكثر فعالية للإصابة الفيروسية حصل عليها فى حالة الفيرس ذو أل DNA، الفيروسات المتجمعة (فيروسات الجوزاء Geminivirus). هذا من المحتمل أن يكون بسبب موقع التناسخ والتجمع للفيرس، فإن الفيروسات المتجمعة تكون فى الأنوية بينما مع الفيروسات ذات RNA النباتية تكون موجودة فى السيتوبلازم، وبالتالى فإن تضاعف الفيروسات المتجمعة وتناسخ RNA مضاد المعنى Antisense تحدث فى نفس الموضع والذى يكون أكثر ملائمة لتكوين معقدات من مضاد المعنى وتتابعات الهدف، عند مقارنتها مع مواقع الفيروسات ذات RNA ومتطلباتها لنقل نسخ مضاد المعنى من النواة إلى السيتوبلازم وما يتبع ذلك من وقف للتناسخ.

هذه الحقائق تدعم فكرة أن الإصابة الفيرويدية أيضاً يمكن تثبيطها بكفاءة بواسطة RNA مضاد المعنى antisense بسبب موقعها فى النواة. إن عدم وجود دليل لأى ناتج مترجم للفيرويدات وعدم وجود غطاء بروتينى، فإن جميع النشاطات الأنزيمية والوقاية ضد التحطيم وتجهيز وتخزين الفيرويد يجب أن تتم بواسطة العائل وأن المعلومات الوراثية لـ RNA الفيرويدى لا يمكن أن تكون التتابع للبروتين ولكن يجب أن تكون لتركيبه الخاص.

من المفترض أن معظم الفيرويدات تتناسخ بسلوك غير متماثل شاملة ميكانيكية الدائرة الملتفة لانتاج أشكال minus - Sense RNA Oligomeric والتى تعمل كقوالب لـ Oligomers of plus - sense polarity والأخيرة تجهز فيرويدات جديدة (خلفه) ذات وحدة طول وبالتحديد plus - polarity. وبالتالى فإن RNA مضاد المعنى يستطيع، فى الأصل أن يتوجه إما ضد ذرية الفيرويد monomeric أو الوسيطات الموجبة ذات المعنى Plus - Sense intermediates بالإضافة إلى أنه يوجه ضد تناسخ الوسيطات Minus - Sense Oligomeric. إنه من غير

الممكن استعمال نسخاً Complete monomeric Copies من cDNA الفيرويدى لـ RNA مضاد المعنى الهدف فى الطبيعة بسبب الطول الكامل لمكملات RNAs التى توجد كوسيطات تناسخ فى النواة بأية طريقة كانت ولا تشكل بسهولة ds RNA فى المعمل. زيادة على ذلك فإن التحول مع مثل cDNA الفيرويدى يمكن أن تحفز الإصابة فى النباتات المحولة.

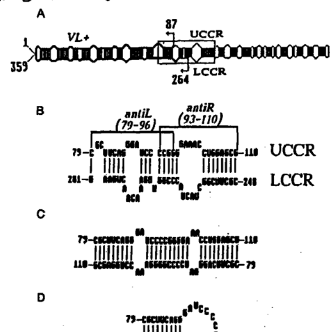
نظراً لأن التركيب والمقاطع التركيبية لـ RNA الفيرويدى كلها معروفة جيداً وهناك نماذج مفصلة موجودة وتوضح شمولها على حوافز تركيبية Structural motifs وخطوات وظيفية مثل التناسخ، التجهيز وغيرها.

فى الجزء الأول من هذه الدراسة كان هناك محاولة لتوجيه RNA مضاد المعنى ضد حافز تركيبى خاص Special Structural motif. إن المنطقة المركزية المحفوظة Central conserved Region (CCR) الذى حدد تتابعها أولاً فى فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd تكون ذات اهتمام خاص بسبب أن تتابعها يكون مميزاً لجميع صف Class الفيرويدات. إن ما يسمى صف PSTVd من المفروض أن يكون هو الأساس فى نشوء الفيرويدات. إن CCR تتكون من منطقة عليا UCCR ومنطقة سفلى LCCR (شكل ٣٢) واللتان معاً تشكلان قطعة من التركيب شبه العصوى الأصلى للفيرويد. وحسب معلوماتنا الحالية (١٩٩٤) عن تجهيز الفيرويد، هذا يعنى الانشطار للخيط الموجب-Oligomeric Plus - strand in-termediate من وحدة الطول واللحام لتكوين الدائرة كل ذلك يحدث فى ال UCCR. إن وسيط التناسخ يجب أن يخضع لتحولات تركيبية معينة ليعمل كقالب لتجهيز أنزيمات العائل وإن منع مثل هذا التحول بسبب تداخل RNA مضاد المعنى يمكن أن يثبط تجهيز الفيرويد وبالتالى تناسخ الفيرويد فى الطبيعة.

فى الجزء الثانى من هذه الداسة فقد أختير cDNA ليغطى النصف الأيسر فقط من التركيب الثانوى شبه العصوى للفيرويد كتركيب RNA مضاد المعنى ضد تناسخ الخيط السالب الوسيط. هناك مستوى منخفض جداً من الخيوط السالبة

الوسيطة فى خلايا النبات المصابة بالمقارنة مع ذرية الفيرويد الدائرية. إن تركيز الخيوط السالبة يصل إلى مستوى أكثر تبكيراً خلال الإصابة منه فى-Plus mono-mers مبيناً أن الوسيطات السالبة تكون إما قد بنيت على معدل منخفض أو تحلل بسرعة أكثر عند مقارنتها مع Plus monomers. وبالتالى فإن توجيه RNA مضاد المعنى ضد minus - sense oligomers يمكن أن يكون ذو استراتيجية أكثر كفاءة من التوجيه ضد ذرية الفيرويد Plus - Sense Viroid Progeny.

ولقد تبين قبل ذلك أن القطع القصيرة من ال DNA وال RNA المكملة تستطيع أن تثبط الإصابة بالفيرويد، هذا ما وجده Matousek سنة ١٩٩٤. هذه القطع كانت تحضن فى المعمل مع PSTVd والمعقد المتكون سابقاً كان يحقن فى النبات كان التثبيط أكثر فعالية عندما كان التحضين يجرى على درجات حرارة عالية حيث التركيب الثانوى للفيرويد كان يدنتر. وكنتيجة لهذه المعطيات فإن مركبات RNA مضاد المعنى الفيرويدى من الممكن أن لا يتكون تحت الظروف الفسيولوجية، التجهيز الخلوى لكل من بناء الفيرويد وال RNA مضاد المعنى ذو الفائدة وتكوين المركب يجب أن يقلد ويدرس فى المعمل تحت الظروف الفسيولوجية. بناء وسيطات تناسخ الفيرويد وال RNA مضاد المعنى يمكن أن تجرى فى المعمل عن طريق النسخ من قوالب DNA باستعمال أنزيم-T_7 RNA Polyme-rase وتكوين مركبات بين RNA الهدف ومضاد المعنى، يمكن أن يتبع ذلك تقدير كمى بواسطة المدراج الحرارى للهجرة الكهربائية فى الجيل- Temperature gradient gel electrophoresis والذى يرمز له TGGE وبواسطة الأجسام المضادةanti dsRNA antibodies. لقد ظهر أن ال RNAs مضادات المعنى المختارة ضد الخيط الموجب وأيضاً ضد وسيطات تناسخ الخيط السالب تشكل مركبات ثنائية الخيط متخصصة مع أهدافها تحت الظروف الفسيولوجية، وهذا وسيط لـ RNA مضاد المعنى ذو أهمية فى تأثيرات التثبيط على إصابة الفيرويد قد لوحظت فى الطبيعة باستعمال نباتات بطاطس تجهز RNA مضاد المعنى.



شكل رقم ٣٢ :

RNAs مضاد المعنى والهدف. A= تركيب ثانوى للفيرويد PSTVd مع المنطقة المحفوظة المركزية (UCCR / LCCR) وموقع RNA VL+ مضاد المعنى (الخط السميك) والذى يوجه ضد نسخ سالبة الخيط. B= توضح UCCR و Anti L.L CCR تمثل RNA مضاد المعنى مع التتابع التكميلى لتتابع الفيرويد (٧٩ ـ ٩٦) و anti R تمثل RNA التكميلى مضاد المعنى لتتابع الفيرويد (٩٣ ـ ١١٠). أما C= التركيب الثلاثى الحلزونى المتكون بواسطة وحدتين من UCCR. أما D= تركيب دبوس الشعر I المتكون ضمن الجزئ فى القواعد الزوجية للتركيب UCCR.

النتائج Results

١ ـ تحليل المركب المتكون من RNA مضاد المعنى و RNA الهدف فى المعمل :

إن RNA مضاد المعنى أختير ضد المنطقة المركزية العليا المحفوظة (UCCR) شكل ٣٢ فى نسخ الشريط الموجب بسبب دوره الأساسى فى تجهيز الفيرويد. هناك فى وسيطات تناسخ ال Oligomeric إثنتان من UCCR من الممكن أن تشكل منطقة حلزونية (لولبيه) ثلاثية ثابتة مكونة من ٢٨ زوج قواعد معترضة بواسطة إثنتين فقط

من العروات الصغيرة الداخلية (شكل ٣٢، C). هذا التركيب يكون نتيجة نوع التتابع المتعاكس Palindromic لمنطقة UCCR. كذلك أيضاً فإن RNA مضاد المعنى إذا تكامل مع الطول الكامل لمنطقة UCCR يستطيع أن يشكل تركيبات لجزئ داخلي ثابت حلزوني ثلاثي أو تركيب دبوس الشعر I (شكل ٣٢، D). هذه التركيبات بإمكانها أن تتنافس مع المركبات المتكونة من RNA الفيرويدي ومضاد المعنى. من أجل ذلك الغرض أيضاً فإن إثنين من RNAs مضاد المعنى أقصر أختيرا مكمـلان للجزء اليسار anti L أو للجزء اليمين من UCCR anti R (شكل ٣٢، B). الذى يمكن ملاحظته فى الهجرة الكهربائية فى أل- Polyacrylamide geI أن ال RNA مضاد المعنى ذو الطول الكامل فإنه فعلاً يشكل أساساً (إلى حد بعيد) Dimers أو جزئ بينى لدبابيس الشعر. هذا أدى إلى الاستعمال الكبير لتتابعات مضاد المعنى الأقصر anti L و anti R بالنسبة للإختبارات المعملية بالإضافة إلى تحولات النبات. إن نسخ الخيط الموجب Dimeric من الفيرويد PSTVd تعمل كالنموذج الأصغر لوسيطات نسخ أكبر. إنها تمتلك موضعين للانشطار وموضع واحد للالتحام رغم أن التجهيز ممكن أن يحدث على موضع واحد فى الفيرويد.

إن تحليل المركب المتكون بواسطة الطريقة TGGE لها من الفوائد أكثر من الطرق الأخرى حيث أنها تسمح للباحث ليس فقط بفصل RNA المعقد من غير المعقد ولكن أيضاً للتفريق بين أشكال ال RNA المختلفة. لقد طبقت أول مرة سنة ١٩٨٨ بواسطة Hecker et al لتحليل المركب المتكون من خيوط سالبة وموجبة مع تتابع PSTVd. فى هذه التجربة إقتصر التحليل على ما يسمى تجربة ما قبل النسخ Pre - transcription والتى فيها كان RNA مضاد المعنى موجوداً مسبقاً فى المخلوط عندما بدأ نَسخ نُسخة من ال Dimeric.

إن التحليل بطريقة TGGE أجرى مباشرة بعـد توقـف النسـخ بواسطة إضافة ٥ ملى مول EDTA. يظهر على الجيل فى شكل ٣٢، A الذى فيه المركب المتكون مع anti L كان قد تحلل، عديداً من المنحنيات للتحول واضحة، هذه يشار إليها

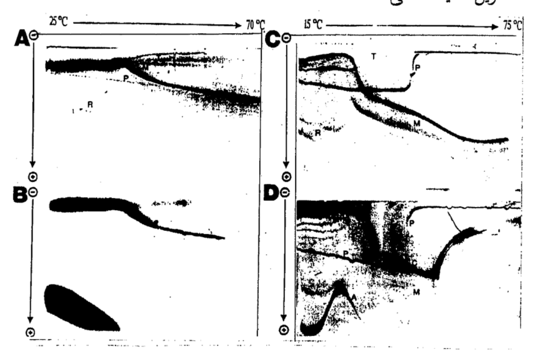
بواسطة R ، M ، T حيث حصل عليها مشابهة جداً لما ظهر عندما حللت نسخة من ال Dimeric فقط. يجب أن نذكر هنا بأن منحنى التحول M (عديد دبابيس الشعر) يكون مميز لموقع اليمين بعد النسخ، هذا التركيب لا يكون فى توازن ثيرمو ديناميكى ولكن يخضع لتغيرات بطيئة فى تركيبات مثلث بواسطة منحنيات T (حلزون ثلاثى، شكل ٣٢) و R (شبه عصوى فى شكل ٣٢) بالإضافة إلى الثلاثة منحنيات T ، M ، R فإن الشرائح بين T و M تظهر بوضوح والتى يمكن أن تكون نشأت من مركبات نسخة RNA مضاد المعنى. أما الشريحة P تتبع إلى ناقلات نسخ البلازمد التى لم تزال من المحلول. يمكن أن يعرف المركب تعريفاً لا لبس فيه من الصورة الإشعاعية الذاتية (شكل ٣٣ ، B) من التجربة المثالية. ويبدو واضحاً أن RNA مضاد المعنى المعلم إشعاعياً يهاجر ضمن منحنى التحول لتركيب M وضمن الشرائح الإضافية الأضعف. فى دراسات أخرى معملية متضمنة المعاملة بالحرارة للمركبات لنقل التركيب M إلى تركيب T أظهر أن حوالى ١٠٠ ٪ من تركيب M كانت متراكبة بواسطة RNA مضاد المعنى. من التحليل فى شكل ٣٣ ، B ، يبدو واضحاً أن معقدات نسخة RNA مضاد المعنى تكون ثابتة لدرجة حرارة ٦٥°م. أما التحليـل لـ anti R RNA أعطى نتائج مشابهة جداً.

المعقد المتكون من $_{+}$RNA VL (شكل ٣٣ ، A) ونسخاً سالبة الخيط Olimeric درست باستعمال TGGE وطرق dot - ELISA. إن الخيط السالب دايمرك قد نُسخ من pRH718 بدون وجود RNA مضاد المعنى وحلل بالطريقة TGGE (شكل ٣٣ ، C) وبالمثل كما فى النتائج على نُسخ الخيط الموجب، هناك ثلاثة تركيبات مختلفة يمكن اكتشافها. إن التركيب السائد الذى يميز للموقع المباشر بعد النسخ يمثل بالمنحنى M والتركيبات الثابتة R و T تكون موجودة بتركيزات منخفضة فقط. إن الشريحة ذات الكثافة الأكثر إنخفاضاً ولكنها فى موضع موازى لـ M من الممكن أن تمثل نهاية مبكرة. بعد النسخ المبكر للحمض RNA مضاد المعنى فإن

تأثير ربط RNA مضاد المعنى يكون واضحاً فى شكل (٣٣، D) . إن التركيب غير المعقد لـ M قد تلاشى، بينما معظم الجزيئات (أكثر من ٩٥ ٪) هاجرت كمعقد C مع مضاد المعنى. إن RNA مضاد المعنى غير الداخل فى المعقد يشار إليه بـ A . هذا الاتجاه يكون واضحاً من الهجرة الأكثر إنخفاضاً بالمقارنة مع الحالة غير المعقدة، من نفس موقع الجزئ الأحادى فى المدى من ٣٠ ـ ٣٥°م ومن المواقع النموذجية للخيوط المزدوجة المتجانسة بين ٥٥ ـ ٦٥°م. إن الأخيرة هذه تتكون من مناطق ثنائية الخيط مدنتره جزيئاً مظهرة بوضوح كتأخير عنيف ومواقع غير مستمرة إلى حالة أسرع حركة على نفس الدرجة المرتفعة التى تكون مرئية فقط كشرائح مختلطة من RNA مضاد المعنى المفكك ونسخة دايمرك. الارتباط مع التركيبات الأخرى يمكن أن يحدث أيضاً ولكن لا يشارك بصفة معنوية. نظراً لأن التركيب المعقد يغير المنحنيات معنوياً فإن التعليم الإشعاعى كما فى حالة الشكل ٣٣ B ليس ضرورياً، كما فى النتيجة الهامة من التحليل بطريقة TGGE. يمكن القول بأن التركيب المعقد من VL_+ RNA مضاد المعنى والوسيطات من الخيط السالب دايمرك تحدث مع إنتاج يقارب ١٠٠ ٪ تحت الظروف التى تشبه الظروف الطبيعية (فى الطبيعة). بعد تحضين RNA مضاد المعنى الذى نسخ كلية ونسخة خيط سالبة دايمرك على ٣٧°م وجد أن هناك ٣٠ ٪ من النسخ فقط من المعقد.

إن النتائج المتحصل عليها بواسطة TGGE قد تأكدت بواسطة طريقة- Dot ELISA وذلك باستعمال جسم مضاد monoclonal متخصص لـ ds RNA. فى الخطوة الأولى من التجربة فإن خمسة أضعاف مولر زيادة من RNA مضاد المعنى فوق RNA الهدف كانت حضنت على حرارة مرتفعة ثم بردت إلى درجة حرارة التحليل. كما فى جدول ١٩ فإن ds RNA قد تشكل بإنتاج أعلى عندما حضن على درجات حرارة مرتفعة ولكن ١٠ ـ ٢٠ ٪ فقط من VL_+ قد لوحظت وكأنها فى المعقد مع RNA الهدف على درجات حرارة مقاربة للحرارة الفسيولوجية. وعلى أية حال إذا كان النسخ للخيوط السالبة ترايمرك قد حدث فى المعمل فى وجود RNA ثنائى الخيط مضاد المعنى موجب قبل النسخ، فإن التكوين يتجه تقريباً لتكملة المكونـات التى يبدو وأنها فى تركيز مولر منخفض. لم يكتشـف معقدات

وعلى أية حال بالنسبة لنُسخ المائة وتسعون نيوكليتيدة لها نفس القطبية ds RNA كما فى RNA الهدف. حتى بعد النسخ فإن الهضم بأنزيم DNase والاستخلاص بالفينول فقط فى الكمية الكلية من الحمض الأمينى، هذا يعنى أنه يمكن تحديد كمية الخيوط السالبة Trimeric والنسخ مضادة المعنى والنسبة المئوية للخيوط الثنائية لأى من الجزيئات يمكن تقديرها بصعوبة. يلاحظ أن إجراءات الهضم بأنزيم DNase، الاستخلاص بالفينول والترسيب التى تتبع النسخ لا تغير المدى لتكوين الخيط الثنائى.



شكل رقم ٣٣:

TGGE لمعقد متكون بين RNA مضاد المعنى و RNA الهدف. الشريحة A و B تظهر تحليل معقدات من RNA قصير مضاد المعنى (anti L) ونسخ دايمرك موجبة الخيط من الفيرويد PSTVd بعد Pre - transcription للحمض RNA مضاد المعنى. شريحة A تمثل جيل مصبوغ بالفضة، شريحة B تمثل autoradiogram من RNA مضاد المعنى معلم إشعاعياً. إن أسرع شريحة فى الهجرة فى ال autoradiogram تكون أكثر احتمالاً من معقدات RNA مضاد المعنى مع النسخ المنتهية مبكراً. أما شريحة C فتمثل نسخة دايمرك سالبة الخيط. أما شريحة D تمثل نسخة دايمرك سالبة الخيط بعد Pre - transcription مع +VL لـ RNA مضاد المعنى. إن الشرائح معلمه لثلاثة تركيبات مختلفة (R, T, M). T = التركيب الثلاثى الحلزونى، M = تركيب متعدد دبابيس الشعر، R= التركيب المتطاول شبه العصوى مشابهة للفيرويد الموجود فى الطبيعة. أما P فهى ناقل النسخ.

جدول ١٩ : اكتشاف ds RNA بواسطة dot ELISA .

درجة الحرارة الأولية للتهجين مْ	٩٠	٨٠	٧٠	٦٠	٥٠	٤٠	٣٠
كمية المواقع المستهدفة ٪	٦٥	٦٥	٦٥	٦٥	٥٠	٣٠	١٥

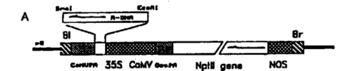
٢ ـ تعبيرات RNA مضاد المعنى فى نباتات البطاطس المحولة وراثياً:

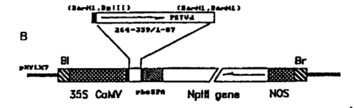
إن ناقلات التعبير تحمل تتابعات مضاد المعنى بعد بدء النسخ، إن 35S CaMV المحفز ملاحظة فى شكل ٣٤. أما فى شكل ٣٤، A فإن التركيبات من anti R و anti L مع مواقع CaMV Polyadenylation تكون موصوفة. هناك تركيبان آخران مشار إليهما anti RvT و anti LvT ، موقع ال Polyadenylation قد شطبت. إن ناقل التعبير لتتابع مضاد المعنى VL_+ يحمل إشارة rbsC لـ Polyadenylation (شكل ٣٤، B). عليات التعبير نقلت إلى جينوم البطاطس بواسطة الناقل-A. tume-faciens والدورة الأولى من الاختبار أجريت على أساس مقاومة التجذير فى الخلفة لـ Kanamycin. إختيرت نباتات البطاطس المحولة وراثياً واختبرت لتعبير RNA بواسطة طريقة تحليل Northern.

فى النباتات التى حولت لتعبيرات RNA مضاد المعنى ضد UCCR، فقط فى المتحولات فقدت جزء من مواقع أل Polyadenylation (anti LvT, anti RvT) تعبير RNA مضاد المعنى أمكن اكتشافه. فى ١١ من ١٢ من المتحولات فإن RNA مضاد المعنى قد اكتشفت. كما هو ملاحظ فى شكل ٣٥، A فإن الحجوم كانت حوالى ٥٠٠ ـ ٦٠٠ نيوكليتيدة بدلاً من الحجم المتوقع ٢٥٠ نيوكليتيدة. من الممكن أن يكون ذلك فى الشطب فى مواقع ال Polyadenylation النهاية الصحيحة لـ RNA مضاد المعنى يكون مشوهاً ومنتجات أطول قد بنيت. التعبير لمنتجات مختلفة (٥٠٠ ـ ٦٠٠ نيوكليتيدة) يمكن أن تكون نتيجة مراحل غير ناضجة مختلفة من النسخ. ومن المحتمل أيضاً أن تركيبات ال anti RvT و anti LvT فقط مع مواقع النهايات الطرفية disorted تنتج RNAs مضاد المعنى ذو ثبات كاف والتى يمكن اكتشافها بطريقة Northern analysis. لكى نتأكد من أن الإشارات المكتشفة فى شكل ٣٥، A الجزء العلوى ليست النتائج للإصابة الفيرويدية ولكن

من تعبيرات RNA مضاد المعنى، إن التهجين المنظم مع نسخ خيط سالبة معلمة إشعاعياً من PSTVd كانت منجزة. إن الشكل ٣٥، A الجزء السفلى يبين عدم وجود إشارات من PSTVd الدائرى يمكن اكتشافه فى النباتات المحولة وراثياً.

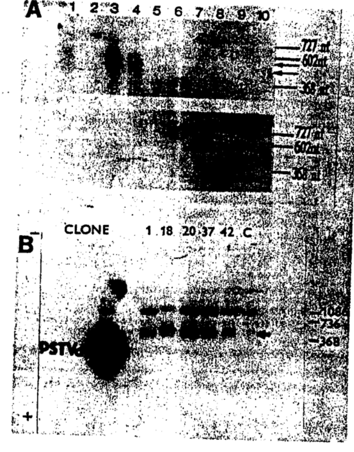
هناك ٦ كلونات محولة مع التركيبات VL_+ أظهرت تعبيرات لـ RNA خاص والتى لم تكن ملاحظة فى نباتات الكنترول (الشكل ٣٥، B). إن طول ال RNA كان حوالى ٦٠٠ قاعدة. وعلى هذا الأساس فإن القطعة مضادة المعنى الخاصة بـ PSTVd (١٨٣ قاعدة) مساوية ٣٠٪ من مجموع ما عبرٌ عنه RNA. لم تستعمل ظروف غسيل شديدة بعد التهجين وبالتالى فإن بعض الشرائح غير المتخصصة فى ال auto - radiogram لم يمكن استبعادها. وحسب التقدير الأولى فإن كمية RNA مضاد المعنى الكاملة تختلف من ٠,٥ ـ ٢,٥ بيكوغرام لكل ٣٠ ميكوغرام من مجموع RNA معتمداً على Clone analysed. إن الإشارة الملاحظة لكلون ٦ قورنت مع الإشارة التى تلاحظ عادة لكلون ١.





شكل رقم ٣٤:

عوامل تحول النبات للتعبير عن RNA مضاد المعنى. شكل A: ناقل مكوكى للتعبير عن RNA مضاد المعنى ضد ال UCCR. إن A - DNA يحتوى ١٨ قاعدة زوجية من النيوكليتيدات القصيرة المهجنة (Anti L / Anti L´) أو (Anti R / Anti R´) مع أربعة نيوكليتيدات إضافية كبولى لنكرز لانتاج موقع محدود Smal و EcoR1. أما شكل B فهو ناقل مكوكى لتعبير عن RNA - VL_+ مضاد المعنى ضد نسخ سالبة الخيط. توجيه تتابعات RNA الفيرويدى مشار إليه بأرقام. المواقع المحدودة المستعملة للكلونة موضوعة فى أقواس. أما العلب السوداء فهى مواقع التتابع المنسوخ الموجه من الناقل 35 SCaMV هو فيرس موزايك القرنبيط أما 35S فهو البرومتور و CaMVPA وrbcSPA فهى التتابع للبولى ادينيليشن. NOS، Nptil جين و OcsPA هى مشجع nopaline synthase، النيومايسن فسفوترانسفريز II جين وتتابع البولى ادينيليشن للجين OCS. وكذلك فإن B_1، B_r الحافة اليسرى والحافة اليمنى.



شكل رقم ٣٥:

تعبير RNA مضاد المعنى فى نباتات البطاطس المحولة وراثياً. شكل A. تحليل RNA مضاد المعنى قصير ضد UCCR. أما الشكل (A) العلوى فهو تحليل بالنورثيرن بلوت لنسيج ورقة (RNA) محول وراثياً. (١ ، ٢ ، ٣ ، ٤ ، ٥ و٩) و ١٠ كنترول بعد دنترة الاجاروز والهجرة الكهربائية فى الجيل. شريحة ٦ = ١٠ نانوغرام خيط دايمرك موجب من نسخ PSTVd (٧٢٧) نيوكليتيدة و ١٠ نانوغرام من نسخ PSTVd خيط مونوميرك سالب (٣٦٨) نيوكليتيدة. شريحة ٧ = ١٠ نانوغرام من نسخ PSTVd خيط موجب (٦٠٢) نيوكليتيدة. شريحة ٨ = ١٠ نانوغرام مستخلص خام من PSTVd. الجزء السفلى A نفس بقعة RNA كما فى الجزء العلوى ولكنها غسلت وأعيد تهجينها مع نسخ PSTVd سالبة الخيط معلمه للكشف عن PSTVd تتابعات موجبة. أما شريحة B تحليل لـ VL_+ RNA مضاد المعنى ضد نسخ سالبة الخيط. حوالى ٥٠ بيكوغرام من الفيرويد PSTVd الطبيعى أضيفت إلى الموقع المعلم فى اليسار. C =. RNA من نباتات بطاطس غير محولة وراثياً. تدل الأسهم على RNAs مضاد المعنى معبراً فى النباتات المحولة وراثياً.

٣ ـ تثبيط الإصابة الفيرويدية فى النباتات المحولة وراثياً:

للدراسات الحيوية فإن النباتات المحولة وراثياً تكون قد تكاثرت خضرياً وتضاعفت. بالنسبة للـ anti R و anti L فإن مجموعات محولة من ١٢ نبات من نفس النبات الواحد المتحول حقنت بمستخلص خام من PSTVd. بعد ٤و ٨ أسابيع حللت كمية أل PSTVd وقورنت مع تلك الموجودة فى نباتات الكنترول. بسبب المهاجمة الفطرية فإن جميع النباتات من أنواع الـ anti RvT و anti LvT ماتت قبل الكشف عن محتوياتها من الفيرويد. هذا كان من سوء الحظ نظراً لأن تعبيرات RNA مضاد المعنى قد اكتشفت فقط فى هذه النباتات.

مع أنه لم يكن من المحتمل اكتشاف RNA مضاد المعنى فى النباتات المحولة ذات النوع anti L و anti R، فإن هناك ثلاثة متحولات أظهرت خفضاً فى القابلية للإصابة بالفيرويد PSTVd بعد أربعة أسابيع شكل ٣٦; الجزء العلوى. فمثلاً فى الحالة ذات ١٢ متحول فقط ٢ من ١٠ عقل أظهرت محتويات من PSTVd يمكن اكتشافها وحتى فى هذين الإثنين فإن كمية أل PSTVd كانت أقل منها فى نباتات الكنترول A. وعلى أية حال فإنه بعد ٨ أسابيع من الحقن فإن محتوى جميع النباتات المحولة من الفيرويد كان متقارباً مع الكنترول (شكل ٣٦ الجزء السفلى). وبالتالى فإن الإصابة الفيرويدية لم تكبح بثبات فى النباتات المحولة وراثياً ولكنها تأخرت بشكل معنوى. عندما إختبرت هذه النباتات بعد التكاثر الخضرى المتتابع لمعرفة حيوية الفيرويد فإن تأخر تضاعف الفيرويد لم يمكن تأكيده كتأثير معنوى.

إن الستة VL_+ المختارة من كلونات البطاطس إختبرت عن طريق التقدير بمقياسين، فهرس الحيوية بالإضافة إلى كمية الفيرويد فى النباتات المصابة. بالنسبة للطريقة الأخيرة فإن الإصابة صنفت إلى أربعة درجات. نتائج إختبارات مثل هذه الإصابة موجودة فى جدول ٢٠. إن إحدى وعشرون يوماً بعد الحقن (P.i) فإننا عادة ما نلاحظ إصابة ضعيفة جداً للفيرويد PSTVd ومعظم النباتات المصابة تقع

فى رتبة ثلاثة وأربعة، نموذجياً مع ٠,٠٣ ـ ٣ بيكوغرام من الفيرويد لكل ملغرام من المادة الطازجة. مقارنة فهارس الحيوية لكلونات مختلفة ومجموعة الكنترول فى هذا الوقت تدل على خفض معنوى احصائياً للإصابة فى كلونات ١ ، ٦، ٢٠ و ٣٧ عند مقارنتها مع الكنترول غير المحول. فمثلاً فإن قيمة G كانت ٢٣ ، ٢٦ ، ٢٤ و ١٨ لكلونات ١ ، ٦ ، ٢٠ و ٣٧ بالترتيب. إن التساوى فى النسبة المئوية للنباتات المصابة يجب أن يطرح على مستوى ٠,٠٠١ من المعنوية الإحصائية. بالنسبة لكلون ١٨ فإن الاختلافات كانت معنوية على مستوى ٠,٠١ ولم يكن هناك إختلافات معنوية ملاحظة بين كلون ٤٢ ومجموعة الكنترول. كذلك فإن النتيجة قد أوضحت فرق كبير بين مختلف الكلونات المتحولة. فى بداية الإصابة (٢١ يوم بعد الحقن) فإن جميع النباتات المحولة وراثياً والمحقونة كانت (باستثناء واحد من كلون ٢٠) هذه فقط ضعيفة الإصابة (مرتبة ٣ و٤)، بينما أكثر من ٤٠ ٪ من نباتات الكنترول المحقونة تقع فى مرتبة ٢ ، هذا يعنى نباتات متوسطة الإصابة. أخيراً فإن ٣٥ يوم بعد الحقن فإن جميع فهرس الحيوية قد إزداد لكن لا يزال معظم الكلونات تختلف معنوياً عن الكنترول. مع أن مستوى PSTVd قد ازداد بشكل مثير، فإن متوسط كمية أل PSTVd فى الكلونات المصابة كان بشكل واضح أقل منه فى نباتات الكنترول. وعلى أية حال فإن كلون ٤٢ لم يختلف عن مستوى الكنترول (جدول ٢٠) هذه تؤكد بشكل عام الملاحظات التى شوهدت من قبل. هناك إصابات أقوى شاملة إلى حد ما قد حصل عليها بعد ٣٥ يوم من الحقن بالمقارنة فى التجربة فى جدول (٢٠، b) ومعظم النباتات المحقونة كانت مصنفة فى مراتب الإصابة ١ ـ ٣. فى سلسلة إختبارات الحيوية الثانية لقد تم إختيار تجمعات الفيرويد فى أنابيب. بالنسبة لكلونات ١ ، ٢٠ و٣٧ فإن نسبة الأنابيب المصابة قدرت بعد ٩٠ يوم من الحقن (جدول ٢١)، هذه النتائج أوضحت فى الأنابيب نفس النزعة كما فى نسيج الورقة الأخضر.

جدول ٢٠ : إختبار الإصابة فى نباتات البطاطس المحولة وراثياً.

كلونات محولة	عدد النباتات المحقونة	عدد النباتات المصابة رتب الإصابة ٤	٣	٢	١	فهرس الإصابة عدد النباتات المصابة على عدد النباتات المحقونة
A : إختبارات الإصابة، ٢١ يوم بعد الحقن.						
١	١٧	صفر	صفر	١	١	٠,١٢
٦	٢٤	صفر	صفر	صفر	١	٠,٠٤
١٨	١٥	صفر	صفر	٤	٢	٠,٣٣
٢٠	١٨	صفر	١	١	صفر	٠,١١
٣٧	١٦	صفر	صفر	١	٣	٠,١٩
٤٢	٢١	صفر	صفر	٤	٣	٠,٥٧
غير محولة	٢١	صفر	٨	٨	٢	٠,٨٦
B : إختبارات الإصابة، ٣٦ يوم بعد الحقن.						
١	١٧	١	صفر	١	٦	٠,٤٧
٦	٢٤	٤	١	٤	٣	٠,٥٠
١٨	١٥	٤	١	٤	٣	٠,٤٧
٢٠	١٨	١	٢	صفر	١	٠,٤٧
٣٧	١٦	صفر	٥	صفر	٢	٠,٤٤
٤٢	٢١	٦	١	صفر	٢	٠,٧٥
غير محولة	٢١	١٥	٣	٢	صفر	٠,٩٥
C : إختبارات الإصابة بعد نصف سنة من التكاثر الخضرى، ٣٥ يوم بعد الحقن.						
١	٢٣	٣	٥	٣	صفر	٠,٤٩
١٨	١٦	٤	٤	٢	صفر	٠,٦٢
٢٠	١٨	١	١	٢	١	٠,٢٨
٣٧	٣٢	٣	١٠	٦	صفر	٠,٥٩
٤٢	١٨	٨	٢	٢	صفر	٠,٦٧
غير محولة	٢٩	١٤	٤	١٠	صفر	٠,٩٦

١ ـ رتبت الإصابة حسب كمية الفيرويد PSTVd فى الأوراق المصابة: ١ = قوى: ٣٥ ـ ١٠ بيكوغرام / ملغ مادة طازجة. ٢ = متوسطة: ١٠ ـ ٣ بيكوغرام / ملغ. ٣ = ضعيفة = ٣ ـ ٠,٣ بيكوغرام / ملغ، ٤ = آثار = ٠,٣ ـ ٠,٠٣ بيكوغرام / ملغ

جدول ٢١ : تحليل الإصابة بفيرويد PSTVd فى درنات البطاطس. لحقن النباتات المتكاثرة خضرياً يكون مشابهاً لتلك التى فى الجدول السابق رقم C.

الكلون المحول	عدد الدرنات المختبرة على عدد النباتات التى هى حاملة الدرنات	٪ الدرنات المصابة
١	٢٧/١٠	٤٤
٢٠	٢٦/١٠	١٩
٣٧	٣١/١٠	٧٧
٩٥	٣٨/١٥	٩٥

4 weeks after PSTVd inoculation

10 11 A 12

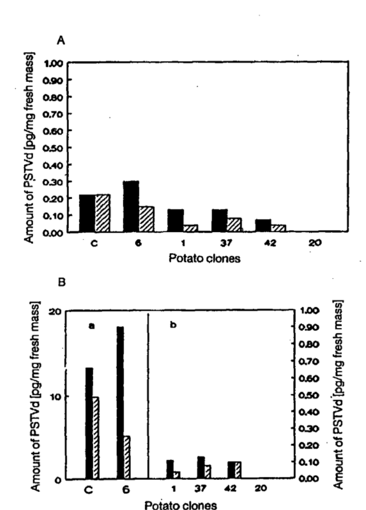
8 weeks after PSTVd inoculation

11 A 12

شكل رقم ٣٦ :

تثبيط الإصابة الفيرويدية فى نباتات البطاطس المحولة وراثياً. تحليل حقن PSTVd فى الطرز المحولة وراثياً (١٠، ١١ و١٢) وفى الطراز غير المحول وراثياً الكنترول. A الطرز المحولة وراثياً ١٠ و ١١ تحولت مع RNA anti R مضاد المعنى، الطراز ١٢ مع RNA anti L مضاد المعنى. عقل البطاطس حقنت بمستخلص خام من النباتات المحقونة، وعزل الحمض النووى بعد ٤، ٨ أسابيع. نقلت مضاعفات من المستخلص على غشاء نايلون وهجنت مع نسخة PSTVd سالبة الخيط. إختبرت عشرة أفراد من كل طراز بمحول وراثياً أمّا فى الشريحة السفلى فإن تسعة نباتات من طراز ١٠ و ١١ وعشرة نباتات من طراز ١٢ بالترتيب.

يمكن تلخيص النتائج المتحصل عليها سابقاً بأن هناك إختلافات كبيرة ليس فقط بين الجينوتايب المختلفة ولكن أيضاً بين مختلف النباتات من نفس الكلون ضمن التجربة الواحدة. عند مقارنة التجارب المختلفة بعد التكاثر الخضرى لـ VL_+ المتحول جدول ٢٠ أدى إلى وجود على الأقل جينوتايب واحد كلون ٢٠، أظهرت مستوى ثابت منخفض من الإصابة بالفيرويد PSTVd وبالتالى أظهرت أعلى الدرجات من التثبيط للإصابة بالفيرويد. من ناحية أخرى حتى ضمن هذا الكلون فإن النباتات المصابة بشدة (مرتبة ١) قد لوحظت، هذا أدى إلى الاقتراح بأن المقاومة المحتملة يمكن أن تتحقق عن طريق التوسط بواسطة RNA مضاد المعنى لم تعمل، إذا كان من الممكن أن بعض المستوى البسيط من الفيرويد وصل فى نسيج النبات. إن الاختلافات العالية فى تجمع الفيرويد حتى ضمن الجينوتايب الواحد يمكن أن تنتج من إختلاف تعبير RNA مضاد المعنى فى النسيج المختلف من الممكن أن يتسبب عن DNA methylation وخفض التعبير فى علب T - DNA. لكى تجعل التجربة فى ظروف مثالية يؤخذ عديد من ال Subclonings من الجينوتايب VL_+ المحول وتوضع علـى بيئة محتوية 5`azacytidine وأجرى إختبار The leaf disc agroinoculation تحت ظروف إضاءة وحرارة قياسية فى Clima - boxes (شكل ٣٧). إن فحص معدل تجمع الفيرويد أظهر مستوى منخفض جداً من التجمع بعد عشرة أيام من ال agroinoculation. بعد ٢٠ يوم ظهرت تجمعات قوية للفيرويد فى أقراص الورقة الكنترول وفى أقراص ورقة كلون رقم ٦ . كان هناك إنخفاضاً شديداً فى مستوى التجمع لوحظ فى كلونات ١ ، ٣٧ و ٤٢ ولم يمكن اكتشاف فيرويد لكلون ٢٠ . يجب أن نذكر هنا أنه لم يكن هناك إختلافات معنوية فى مستوى PSTVd فى الحلقة الخارجية ومركز القرص فى تنوع الكنترول بينما المستوى من PSTVd قد إنخفض معنوياً فى أنسجة مركز القرص من الجينوتايبات المحولة. هذا الميل أو النزعة لوحظت حتى فى أقراص من الجينوتايب المصابة بشدة رقم ٦ شكل ٣٧، A.



شكل رقم ٣٧ :

مستويات من PSTVd فى Agroinfected أقراص ورقة. A = التحليل بعد عشرة أيام من الحقن. B= التحليل بعد عشرين يوم من الحقن. الأرقام تدل على الكلونات المحولة وراثياً. إن حرف C يدل على النباتات غير المحولة وراثياً. فى شكل B الأعمدة فى (a) تدل على التوجيه اليسارى، فى (b) التوجيه اليمنى.

مناقشة النتائج :-

لقد سبق وبينا أن RNA المتخصص لـ PSTVd متماثل الازدواجات وأن ازدواج من نسخ مضادة المعنى طويلة غير كاملة مع PSTVd كانت فعلاً غير معدية فى نباتات الطماطم. هذه النتيجة أدت إلى الاقتراح بأن تداخل RNA - RNA يمكن أن يشكل حقيقة أساس وسيط لـ RNA مضاد المعنى يثبط إصابة الفيرويد. فى هذه الدراسة ثم إختيار RNA مضاد المعنى غير كامل ضد ال UCCR من الخيط الموجب وضد النصف اليسارى من وسيط التكاثر السالب لـ PSTVd لتحليل التأثير المثبط على إصابة الفيرويد فى النباتات المحولة وراثياً. كما ذكر سابقاً فإن التأثيرات المثبطة تصبح متوسطة بواسطة تعبيرات RNA مضاد المعنى الخلوى وقد ذكرت لبعض RNA الفيروسى للنبات و DNA الفيروسى، ولكن النتائج لا يمكن أن تنطبق على الفيرويدات خاصة بسبب الصفات التركيبية الخاصة للفيرويدات والتى تشكل ازواج مضاعفة. هذه الصفة يجب إعتبارها خاصة بالنسبة لوسيطات التكاثر الأطول، والتى بطريقة أخرى يمكن أن تكون هدفاً مناسباً بسبب تركيزها المنخفض فى الخلايا المصابة. مجرد التحضين لـ RNA مضاد المعنى أو الهدف قد أظهر أن التحضين يجب أن يجرى على درجات حرارة عالية غير فسيولوجية لكى نحصل على إنتاج عال من المركب المعقد. لكى نوجه هذه المشكلة فى مصطلحات ثيرموديناميكية إختبر التداخل بين RNA مضاد المعنى و RNA الهدف عندما بنى RNA الهدف تحت ظروف فسيولوجية بواسطة أنزيم T_7 Polymerase فى وجود RNA مضاد المعنى قبل النسخ والمعقد المتكون أجرى له تحليل بواسطة TGGE والاكتشاف بواسطة Immunochemical لـ ds RNA. هناك طرق مشابهة يكون من المحتمل أن تحدث فى الخلايا المحولة وراثياً بعد دخول الكائن الممرض النواة وتكون طريقة التناسخ قد إبتدأت. من التحليل بواسطة TGGE يمكن القول بأن إنتاج المعقد المتكون كان تقريباً ١٠٠ ٪. هذه النتيجة كان من السهل الحصول عليها من المعقدات مع النصف اليسارى من RNA مضاد المعنى، بسبب الانتقال الواضح فى الشرائح. المعقد المتكون من RNA مضاد المعنى القصير ضد

ال UCCR لم يقود إلى إنتقال معنوى ولكن يمنع التغير التركيبى فى RNA الهدف وعلى أساس هذا التأثير فإن ١٠٠ ٪ معقد متكون يمكن أن يستنتج. زيادة على ذلك فإن التحليل المعملى للمعقد المتكون بعد Pre - transcription لـ RNA مضاد المعنى أظهر بشكل جلى واضح أن التركيب لوسيطات تناسخ الفيرويد التى توجد فى اليمين بعد عملية النسخ تكون أساسية لتكوين المعقد بينما الانتظار للتركيب المتوازن يمكن أن يمنع تكوين المعقد.

النباتات المحولة وراثياً حضرت معبرة عن RNA مضاد المعنى ضد الجزء اليمين واليسار من ال UCCR (مع تتابع كامل وشطب ال Polyadenylation) وVL_+ حمض RNA مضاد المعنى (الجزء اليسار من الفيرويد شبه العصوى) ضد الخيط السالب. وجد أن تعبيرات RNA مضاد المعنى اكتشفت فى تحولات anti LvT و anti RvT (مع تأخير إشـارة ال Polyadenylation) ولكن ليـس فى متغيرات anti L وanti P هذا يمكن أن يوضح بعدم الثبات الكاف لهذه ال RNAs فى الطبيعة وعلى هذا الأساس يكون هناك تركيز منخفض جداً للكشف بواسطة Northern analysis. هناك سبب واحد لهذا الافتراض يكون بأنه يمكن اكتشاف T - DNA مضاد المعنى موحد لمتحولات anti LvT و anti RvT بالإضافة إلى متحولات anti R وanti L بواسطة التحليل بطريقة Southern. من الممكن اكتشاف تعبير RNA مضاد المعنى المنخفض فى متحولات anti LvT و anti RvT فقط بسبب RNA مضاد المعنى المعبر كان حوالى ٢٥٠ ـ ٣٥٠ نيوكليتيدة أكبر من المتوقع وبالتالى ثبات أعلى منه فى ذلك الذى من متحولات anti R و anti L. إن VL_+ RNA المضاد المعنى المعبر فى الطبيعة أظهر تقريباً ٦٠٠ قاعدة فى الطول بحوالى ٣٠٪ من التتابع الخاص بمضاد المعنى، لا يمكن أن يحصل عليه بدون شك فى التجارب المعملية سواء RNA المعبر قد كون معقدات مع ال RNA الهدف بكفاءة مثل التى لوحظت فى النسخ المعملية. ولكن يبدو محتمل جداً نظراً لأن المعقد المتكون ذو معنى أو مضاد المعنى يفسد بواسطة تركيب الفيرويد

الجزء البينى وليس بواسطة ازواج قواعد متطابقة من تتابعات خاصة للفيرويد مع تتابعات الناقل المتصلة أو ال Poly A tail .

درس تأثير RNA مضاد المعنى على كلونات بطاطس وحللت النتائج لمعرفة مدى التثبيط للإصابة بالفيرويد PSTVd . أظهرت النتائج أن ظاهرة التثبيط وجدت فعلاً بسبب: أولاً، بعض الطرز المحولة وراثياً تظهر ثبات وخفض معنوى فى الإصابة الفيرويدية فى النباتات والدرنات بالمقارنة مع الكنترول، ثانياً، إنخفاض التركيز للفيرويد اكتشف فى بعض النباتات المحولة وراثياً إذا قورنت مع النباتات غير المحولة وراثياً وأجريت المقارنة خلال ثلاثة أسابيع بعد الحقن (جدول ٢٠ ، A) وحتى ٨ أسابيع بعد الحقن (شكل ٣٦). إن تثبيط الإصابة أو على الأقل التأخير فى تضاعف الفيرويد لوحظ فى النباتات المحقونة بالإضافة إلى بعد Agroinfection .

مع أن تأثيرات التثبيط كانت معنوية، إلا أن إختلافات وراثية عالية قد لوحظت بين الطرز المختلفة، والأكثر أهمية الإختلاف العال الذى لوحظ ضمن كلون واحد متكاثر خضرياً. حتى من بين أكثر الكلونات مقاومة فإن بعض النباتات المصابة بشدة قد لوحظت. إن مظهر النسيج المصاب بشدة دل أيضاً فى هذه الحالة على أن التثبيط بمضاد المعنى يمكن أن يتغلب عليه كلية إذا حصل على مستويات بداية من ال PSTVd فى خلايا النبات عالية وإن سرعة تناسخ الفيرويد لاتثبط لمدة طويلة. إن الاختلافات غير العادية الملاحظة هنا تختلف بوضوح عن DNA مضاد المعنى و RNA الوسيط فى التثبيط الذى لوحظ فى الدراسة السابقة، بينما المعقد RNA الفيرويدى مضاد المعنى كان قد تشكل فى المعمل قبل الحقن. فى تلك الحالة فإن التأثير المثبط كان أكثر قوة، أقل إختلافاً ومعتمد أساساً على زيادة المولر لـ RNA مضاد المعنى زيادة عن PSTVd . إن التأثيرات الموصوفة هنا تختلف أيضاً عن معظم النتائج المتحصل عليها باستعمال RNA مضاد المعنى ضد Endogenous genes . فى هذه التجارب كان هناك متغيرات كبيرة بين الكلونات المختلفة، أيضاً، لوحظت ولكن الكلونات الفردية عادة تسلك معدل منخفض ثابت من m RNA وبالتالى فإن ال الفينوتايب الطافرة يمكن إختبارها.

لقد تبين من الدراسات الحديثة Wassenegger et al سنة ١٩٩٤ أن- Genome integrated viroid cDNA يصبح متخصص methylated فوق تجمعات الفيرويد فى نباتات الدخان المتحولة وراثياً. إن الباحث فسر هذه الظاهرة بواسطة إمكانية أن RNA الموجه ينتج من جديد ميثيليشن لتتابعات الجينوم. إن التغيرات العالية فى وسيطات RNA مضاد المعنى فى تثبيط الإصابة الفيرويدية فى هذه التجارب (تجارب البحث الحالى) يمكن أن تفسر غالباً بهذه الظاهرة. إذا ما حدث وأن بعض حدود مستوى RNA الفيرويدى قد إمتد فإن عملية الميثيليشن لـ-Viroid - specific anti sense gene يشجع (يرتفع). إن التناسخ غير المثبط من PSTVd يكون النتيجة المنطقية. إن ما وجد بأن تأثير مضاد المعنى كان أقوى عندما عوملت أقراص ورقة البطاطس خلال الحقن أيضاً بمادة azacytidine (مثبطة للميثيليشن) والتفسير بأن الاختلافات المعنوية بين كلونات البطاطس المختلفة يمكن أن تتسبب عن أو بواسطة تأثير الموقع على DNA methylation وتكون متفقة مع الافتراضات المذكورة سابقاً.

إن ال Physiological mosaic المعروف جيداً فى خلايا النبات من الممكن أن يقود أيضاً إلى تركيز RNA مضاد المعنى باختلاف من خلية إلى خلية حتى إذا نظم بواسطة محفز تأسيسى. إن المستوى الحدى الأولى من RNA الفيرويدى يمكن أن نصل إليه بسهولة أكثر فى هذه الخلايا بدون تعبيرات RNA مضاد المعنى أو بكمية بسيطة جداً منه، هذه الفيرويدات يمكن أن تنتشـر فى الأنسجة المحيطة. من المعروف أن الفيرويدات تتراكم بسرعة أكثر فى النسيـج المرستيمى ومن هناك يمكن أن تنتقل ضمن النبات خلال خلايا اللحاء هذا ما وجده Palukaitis سنة ١٩٨٧.

فى هذا النسيج فإن التناسخ يمكن أن يحدث بمعدل أعلى، بينما مستوى RNA مضاد المعنى يمكن أن يكون غير كاف تماماً لأن يتداخل مع مسار التناسخ وبالتالى يقود إلى تنافس مختلف تماماً. من هذا الاتجاه فإن نتائج البحث تكون أكثر تشابهاً للتأثيرات الملاحظة لـ RNA الفيروسى للنبات. بالنسبة للفيروسات المتجمعة

(فيروسات الجوزاء) مثل فيرس الموزايك الذهبى فى الطماطم TGMV والذى فيه ال DNA والفيرس يتكاثر داخل النواة، فإن تأثير مضاد المعنى كان أقوى جداً إذا كان إختبار التناسخ فى قرص الورقة قد تم (أنجز) ولكن غير كامل فى بعض الطرز عند حقن النباتات المحولة السليمة. يمكن القول بأنه إذا كانت جينات RNA مضاد المعنى ناشئة مع محفزات غير حساسة لـ methylation DNA فإنها تكون أكثر فعالية.

رابعاً: الوقاية بالتضاد بين أربعة فيرويدات:

Cross Protection Among Four Viroids

تعرف الوقاية بالتضاد على أنها التداخل فى التعبير العرضى عن طريق حقن متحدى (فيرس أو فيرويد) فى النبات المصاب سابقاً. هذه الظاهرة قد أثارت اهتمام أخصائى الفيرس من علماء أمراض النبات وذلك منذ اكتشافها بواسطة Mckinney سنة ١٩٢٩. إن ميكانيكية الوقاية بالتضاد لا تزال محل دراسة وأجرى عليها أبحاث كثيرة خاصة فيما يتعلق بالأمراض الفيروسية خاصة فيرس موزايك الدخان وترستيزا الحمضيات فى البرازيل.

أما عن الوقاية بالتضاد بالنسبة للفيرويدات كان أول وصف لها سنة ١٩٦٧ بواسطة العالم Fernow. لقد وجد أن نباتات الطماطم **Lycopersicon esculentum** الصنف المزروع Rutgers يمكن أن يحفظ من الأعراض التى ستتكشف نتيجة الإصابة بالسلالة الشديدة لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd وذلك عن طريق الحقن المبكر بالسلالة المعتدلة لنفس الفيرويد. زيادة على ذلك فإن العالم Fernow قد أظهر بأن السلالة الشديدة يمكن إعادة اكتشافها من نباتات الطماطم التى لم تظهر عليها الأعراض نتيجة الوقاية بالتضاد.

ملاحظة «هذا البحث قام به مجموعتين من العلماء. الأولى فى جامعة روكفلر فى أمريكا وعلى رأسهم C.L. Niblett، والمجموعة الثانية فى وارسو بولندا وعلى رأسهم العالمة E. Paduch. Cichal وهى التى أمدتنى مشكورة بهذه البحوث».

إن الدراسة التى أجريت على RNA بطريقة بصمة الأصبع Finger printing فى كل من السلالة الشديدة والمعتدلة قد أظهرت أن هاتين السلالتين للفيرويد PSTVd فيهما إختلافات بسيطة فقط فى تتابع نيوكليتيداتها. لقد أجرى عدة أبحاث لتحديد فيما إذا كانت الوقاية بالتضاد التى بين الفيرويدات هى مقصورة فقط على تلك الفيرويدات التى تظهر درجة عالية من تماثل التتابع فى أحماضها RNAs.

لكى نجرى إختبارات الوقاية بالتضاد بين أى فيرويدين فمن الضرورى أن نلاحظ : ـ

١ ـ توفر العائل المشترك بين الفيرويدين موضوع الداسة.

٢ ـ دراسة سابقة لهذين الفيرويدين تثبت بأنهما يتناسخان فى العائل المشترك.

أجريت دراسة الوقاية بالتضاد على نباتات الطماطم و / أو نباتات الأقحوان وذلك باستعمال الفيرويدات الآتية : ـ

١ ـ السلالة الشديدة من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس s - PSTVd.

٢ ـ السلالة المعتدلة من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس m - PSTVd.

٣ ـ فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd.

٤ ـ فيرويد تقزم الأقحوان CSVd.

٥ ـ فيرويد الشحوب المتبرقش فى الأقحوان ChMVd.

أظهرت الدراسات السابقة أن السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة وفيرويد اكسوكورتز الحمضيات تتناسخ فى نباتات الطماطم، بينما الدراسات التى ذكرت عن بصمة الاصبع المذكورة سابقاً قررت أن السلالة الشديدة والمعتدلة لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس ذات علاقة متقاربة جداً. أما عند المقارنة بين PSTVd وفيرويد CEVd لم يظهر مناطق واسعة ذات تماثل متقارب فى RNAs التابعة لها.

نبات الأقحوان:

إن نبات الأقحوان **Chrysanthemum morifolium** عائل هام ومفيد فى دراسة الفيرويد. إن فيرويد تقزم الأقحوان CSVd وفيرويد الشحوب المتبرقش فى الأقحوان ChCMVd قد اكتشفت اصلاً فى هذا العائل وازدادت بشكل واسع فى الأصناف المزروعة مثل Bonnie Jean بالنسبة للفيرويد الأول، والصنف Velvet Ridge للفيرويد الثانى. إن دراسات التهجين التى أجريت بين PSTVd و CSVd أدت إلى القول بأن حوالى ٢٠ ٪ من RNA فى الفيرويد CSVd يكون متماثل مع ذلك الذى فى RNA لفيرويد PSTVd. وبوضوح فإن إختلافات التتابع بينPSTVd و CSVd تكون كافية لانتاج RNA مختلف كلية فى بصمة الأصبع، ولكن يوجد تشابهات كافية تسمح بعملية Cross - hybridization محدودة. إن التطبيقات البيولوجية لهذا التماثل يمكن أن تختبر إذا أصابت هذه الفيرويدات عائل مشترك.

لإجراء التجارب، فى البداية يجب تحديد فيما إذا كان CSVd و ChCMVd يحدث لهما تناسخ فى الطماطم وفيما إذا كنت السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة لفيرويد PSTVd وفيرويد CEVd تتناسخ فى نبات الأقحوان ثم بعد ذلك يختبر كل فيرويد لوحده لمعرفة مقدرته على الوقاية ضد الفيرويدات الأخرى.

تحضير اللقاح:

إن كلا السلالتين من PSTVd وفيرويد CEVd حصل لهما اكثار وزيادة فى نباتات الطماطم صنف Rutgers . إن اللقاحات من هذه الفيرويدات حضرت عن طريق طحن الأوراق المصابة بالفيرويد والمتجمدة (١ : ١، W / V) فى هاون ومدقة مع ٠,٠٤ مول فوسفات البوتاسيوم منظم، pH8 محتوياً ٠,٣ ٪ من-2 - mercaptoe thanol . أما الفيرويدان CSVd و ChCMVd قد حفظا فى نبات الأقحوان. اللقاحات تتكون من مستخلصات كاملة من الحمض النووى من نسيج مصاب

مركزاً بعشرة وعشرين ضعف بالترتيب على أساس وزن النسيج عن طريق الترسيب بالايثانول.

الإختبارات على نباتات الطماطم:

تحقن نباتات الطماطم عن طريق تعفير فلقات البادرات (٢ ـ ٤ مراحل ورقية) بالكرابوراندم ثم تحك الفلقات بماسحة قطنية مغمورة باللقاح (بالمحلول المنظم فى حالة الكنترول). تلاحظ التعبيرات المرضية وتكتب بعد ٦٠ ـ ٧٥ يوم من الحقن. تنقى الفيرويدات من النباتات المصابة وتعلم فى المعمل باليود المشع ١٢٥. يجرى التحليل بواسطة طريقة بصمة الأصبع ذات الاتجاهين لـ RNA قبل وبعد التكاثر فى نباتات الطماطم. إن كلاً من السلالة الشديدة والمعتدلة فى فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وكل من CEVd وCSVd كل منهما أظهر صفات ال RNA المميزة فى بصمة الأصبع، هذا يدل على عدم وجود أى تداخل أو تلوث بين هذه الفيرويدات وأن هذه الفيرويدات تكاثرت بشكل نقى فى النبات، إلا أن الاختبارات الحيوية فشلت فى إثبات تناسخ ال ChCMVd فى نباتات الطماطم.

أما إختبارات الوقاية بالتضاد على الطماطم فقد أجريت كما ذكر Fernow سنة ١٩٦٧. كانت الحقنة الأولى فى طور الفلقة، أما الحقنة بالفيرويد المتحدى فقد أجريت بعد ١٤ يوم، عندما كانت النباتات تحمل ٣ ـ ٤ مراحل ورقية وإن جميع الأوراق باستثناء أصغرها قد حقنت.

الإختبارات على نباتات الأقحوان:

فى الإختبارات على نبات الأقحوان فإن ٦ ـ ١٠ عقل مجذرة (لها جذور) ذات طول ١٠ ـ ١٥ سم قد حقنت عن طريق وضع قطرة من اللقاح متوسطة الجحم على الساق ويعمل ٢٥ ثقب عميق خلال القطرة فى الساق باستعمال نصل مشرط نمرة ١١، تحفظ النباتات فى الصوبا الزجاجية على درجة ٢٢ ـ ٢٨°م أو فى إطارات التنضد على درجة ٢٨°م وإضاءة ٢١٦٠٠ شمعة مع ١٦ ساعة إضاءة يومياً. كانت تحقن النباتات بالفيرويدات الخمسة المذكورة سابقاً.

الأعراض التى تظهر تدل على أن كل من الفيرويدات الخمسة قد تكاثرت. إن طريقة بصمة الأصبع لـ RNA لكل من العزلة الشديدة والعزلة المعتدلة و CEVd و CSVd أثبتت أنها قد عزلت من نباتات الأقحوان وقد أثبتت تطابق كل من هذه الفيرويدات. لم يكن باستطاعة بصمة الأصبع اكتشاف ChCMVd نظراً لانخفاض الناتج منها.

عند إجراء إختبارات الوقاية بالتضاد على الأقحوان فقد أجريت باستعمال ضعف التركيز من الحمض النووى من السلالة الشديدة والمعتدلة و CEVd و CSVd وعشرين ضعفاً من تركيز ChCMVd. أجريت الحقنات بالفيرويد المتحدى بعد ٤٠ ـ ٥٠ يوم على ساق غير محقون مظهراً أعراض واضحة للفيرويد الأول. النباتات المختبرة قدرت على أساس نوع الأعراض المنتجة، شدة الأعراض و / أو تاريخ ظهور العرض (جدول ٢٢). الأوزان والأطوال لنباتات الطماطم أيضاً سجلت فى الملاحظات فى نهاية التجربة.

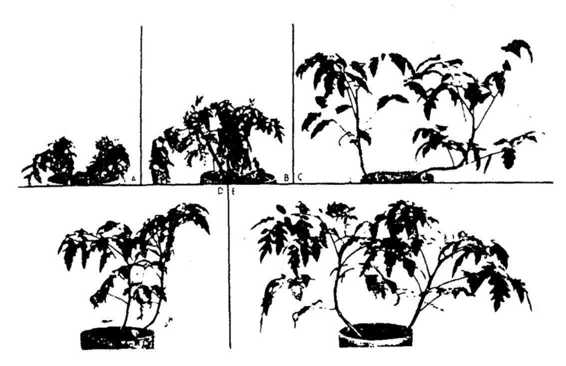
نتائج الإختبارات:

يمكن دراسة كل فيرويد بمفرده لمعرفة مقدرته على أن يبقى محافظاً على نفسه ضد الفيرويد الثانى إذا كانت الأعراض التى ينتجها تختلف بوضوح من و / أو أقل شدة من الأعراض المتسببة فى ذلك النبات بواسطة الفيرويد المختار (جدول ٢٢). يذكر وصف الأعراض لكل فيرويد على نباتات الطماطم والأقحوان مجتمعة مع ذكر الوقت المطلوب لظهور التعبير العرضى بواسطة إختبار نصف الورقة فى نباتات الطماطم.

١ ـ نتائج الإختبارات على الطماطم:

إن حقن نباتات الطماطم بالسلالة المعتدلة لوحدها سبب أعراضاً بسيطة جداً ولكنها خفضت الوزن وطول النبات بنسبة ٣٠٪ (شكل ٣٨ C، جدول ٢٣). أما نباتات الطماطم المحقونة بالسلالة الشديدة أو CEVd لوحدها تكشف عليها أعراض

شديدة مثل تقزم القمة الشديد، الالتفاف والتدلى والنكروزز، هذه الأعراض نموذجية للسلالات الشديدة من PSTVd والفيرويد CEVd وقد خفضت فى الوزن بنسبة ٧٠ ـ ٨٠٪ وخفضت الطول بنسبة ٥٠٪ (شكل ٣٨ وجدول ٢٣).



شكل رقم ٣٨ :

الوقاية بالتضاد فى نباتات الطماطم صنف Rutgers عن طريق الحقن بالتتابع بالسلالة المعتدلة من فيرويد PSTVd وفيرويد CEVd. الحقن الأول كان فى طور الفلقات والحقن الثانى بعد ١٤ يوم من الحقن الأول. المعاملة A = حقنت CEVd مع منظم، B = حقنت بالمنظم أولاً ثم بالفيرويد CEVd، المعاملة C = سلالة معتدلة ثم منظم. D = سلالة معتدلة ثم CEVd أما E = حقنت أولاً وثانياً بالمنطم. النباتات صورت بعد ٥٢ يوم من الحقن الأول.

جدول ٢٢ : وصف الأعراض الفيرويدية والوقاية بالتضاد الناتجة فى نباتات الطماطم والأقحوان.

الفيرويدات	الأعراض	اختبارات الوقاية بالتضاد				
	الوصف	الأيام	PS	CEVd	CSVd	ChCMVd
الطماطم CSVd	لا شئ		غير مؤكد	غير مؤكد	—	—
PM	تحت المعدل فى الطول والوزن	٥٢	+	+	غير مؤكد	—
PS	تقزم شديد، تدلى أوراق، تكتل فى القمة	١٨	—	—	—	—
CEVd	تقزم شديد، تدلى أوراق، تكتل فى القمة	١٨	—	—	—	—
الأقحوان PM	بقع شاحبة متوسطة		—	+	—	—
ChCMVd	نظام التبرقش والشحوب		لا يوجد وقاية	لا يوجد وقاية	لا يوجد وقاية	—
PS	بقع شاحبة، تقزم متوسط		—	+	—	لا يوجد وقاية
CSVd	تقزم، بقع شاحبة، تدلى الورقة		+	+	—	غير مؤكد
CEVd	تقزم شديد وتشوه الورقة وشحوب		—	—	—	—

ملاحظات على الجدول:ـ

١ ـ رتبت الفيرويدات تصاعدياً حسب ازدياد شدة الأعراض. PM = السلالة المعتدلة من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس، PSالسلالة الشديدة من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس.

٢ ـ اليوم = يدل متى (على الأقل) نصف النباتات المختبرة أعطت تعبيرات أعراض.

٣ ـ الوقاية بالتضاد أجريت كما هو مشروح فى الموضوع. حقنت النباتات أولاً بالفيرويد المذكور فى الجهة اليمنى من الجدول ثم بعد ذلك حقنت بالمتحدى (١٤ يوم فى الطماطم، ٤٠ ـ ٥٠ يوم فى الأقحوان) بالفيرويدات المذكورة فى أعلى الجدول.

+ تعنى حصلت وقاية. أما (-) تعنى لم تسجل النتائج.

جدول ٢٣ : تأثير الحقن بالفيرويد على تكشف الأعراض وشدتها وعلى الوزن والطول فى نباتات الطماطم صنف Rugers .

المعاملات		الأعراض		التأثير على	
الحقن الأول	الحقن الثانى	الشدة	الأيام اللازمة للظهور	٪ متوسط الوزن بالنسبة للكنترول	متوسط الطول بالنسبة للكنترول ٪
منظم	منظم	–	–	١٠٠	١٠٠
PS	منظم	+++	١٨	٢٨	٤٨
PS	CEVd	+++	١٨	٢٦	٥٣
PS	PM	+++	١٨	٢٨	٥٥
PS	CSVd	+++	١٨	٢٨	٥٦
CEVd	منظم	+++	١٨	٢٠	٤٧
CEVd	PM	+++	١٨	٢١	٤٤
CEVd	PS	+++	١٨	٢٠	٤٦
CEVd	CSVd	+++	١٨	٢٢	٤٧
PM	منظم	+	٥٢	٦٧	٧١
PM	CEVd	+	٥٢	٥٢	٦٨
PM	PS	+	٥٢	٥٤	٦٥
PM	CSVd	+	٥٢	٦٥	٧٠
CSVd	منظم	–	–	٨٩	٩٨
CSVd	CEVd	++	٥٢	٥٧	٦٧
CSVd	PM	+	٥٢	٦٨	٨٥
CSVd	PS	++	٥٢	٥٢	٦٨
منظم	PM	+	٥٢	٧٨	٨٢
منظم	CEVd	++	٣٦	٥٨	٦٠
منظم	PS	++	٣٦	٤٣	٦٠
منظم	CSVd	–	–	٩٣	٩٠

ملاحظات على الجدول :ـ

١ ـ الحقن الأول كان فى طور الفلقات. الحقن الثانى كان بعد الحقن الأول بمدة ١٤ يوم وفى طور أربعة أو ثلاثة ورقات. كان هناك ١٤ نبات لكل معاملة. متوسط الوزن للنباتات الكنترول ٥٥ غرام أما متوسط الطول كان ٤٨سم.

٢ ـ فهرس الشدة كان (–) لا يوجد أعراض، (+) = أعراض معتدلة، (++) أعراض متوسطة، (+++) أعراض شديدة يمكن ملاحظة ذلك فى شكل ٣٨.

٣ ـ استمرت التجربة ٦٥ يوم. يحسب اليوم عندما يظهر نصف أو أكثر من نباتات التجربة الأعراض المذكورة.

حقنت نباتات الطماطم أولاً بمنظم ثم بعد ذلك بالمتحدى مثل السلالة الشديدة أو CEVd ، فكانت النتيجة أن تكشفت أعراض فيرويدية واضحة وخفضت حوالى ٥٠ ٪ من الوزن و٤٠ ٪ من الطول (شكل ٣٨، B جدول ٢٣). مع أن الأعراض المميزة للفيرويد قد أنتجت فى هذه النباتات، إلا أن الأعراض كانت أقل شدة من تلك الواضحة فى شكل ٣٨، A ، نظراً لأن النباتات كانت أكبر بمدة ٢ أسبوع عندما حقنت. على كل حال فإن تعبيرات الأعراض فى هذه المجموعة من النباتات معنوياً وأكثر شدة من تلك الملاحظة فى النباتات المحقونة فى اليوم الأول بالسلالة المعتدلة. النباتات التى حقنت فى اليوم الأول بالسلالة المعتدلة وبالمتحدى ثم بعد ١٤ يوم من ذلك بالسلالة الشديدة أو CEVd كانت غير متميزة عن تلك المحقونة بالسلالة المعتدلة لوحدها (شكل ٣٨، D وجدول ٢٣). وبالتالى فإن الحقن السابق بالسلالة المعتدلة حفظ هذه النباتات من تكشف أعراض فيرويدية شديدة تتسبب عن السلالة الشديدة أو عن CEVd. النباتات الموجودة فى شكل (٣٨، D) كانت قد اختبرت لإظهار القوة القليلة من الأربعة عشر نبات فى تلك المعاملة، علاوة على ذلك فإنها لم تظهر أعراض فيرويدية. التجارب الأخرى المستعمل فيها خمسة عزلات إضافية أظهرت نفس الوقاية.

نباتات الطماطم المحقونة بالفيرويد CSVd لوحده لم يتكشف عليها أعراض مرئية ولم تكن مختلفة معنوياً عن النباتات غير المحقونة فى الطول أو الوزن (جدول ٢٢، ٢٣). وبنفس الطريقة فإن تلك النباتات المحقونة بالفيرويد CSVd والمتحدى مع سلالة معتدلة من PSTVd لم تختلف معنوياً فى الوزن والطول عن نباتات الكنترول المحقونة بعد ١٤ يوم بالسلالة المعتدلة. من ناحية أخرى بينما النباتات المحقونة بالفيرويد CSVd ثم حقنت بالمتحدى السلالة الشديدة أو الفيرويد CEVd ، لحسن الحظ تكشفت أعراض فيرويدية وكان الخفض فى الوزن والطول مشابهاً للنباتات فى الكنترول (النباتات التى حقنت فى اليوم الأول بالمنظم وفى اليوم الرابع عشر حقنت بالسلالة الشديدة أو CEVd). إن إبتداء هذه الأعراض كان قد تأخر حوالى ١٦ يوم (جدول ٢٣). هذه النتائج تؤدى إلى القول بأن CSVd يتدخل مع نشوء

المرضية فى نباتات الطماطم بواسطة السلالة الشديدة والفيرويد CEVd. لقد حصل على مثل هذه النتائج المقنعة باختبارات مماثلة على نباتات الأقحوان.

٢ ـ نتائج الإختبارات على الأقحوان:

إن الأعراض الناتجة من السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة والفيرويد CEVd والفيرويد CSVd والفيرويد ChCMVd يمكن تمييزها بسهولة فى نباتات الأقحوان صنف Bonnie Jean (جدول ٢٢). إن الحقن بالسلالة المعتدلة، السلالة الشديدة أو الفيرويد CSVd تحفظ نبات الأقحوان من إظهار تعبيرات عـرضية للفيرويد CEVd. وعلى أية حال فإن ChCMVd لم يكن حافظاً ضد الأعراض من السلالة الشديدة (شكل ٣٨). أما فى التجارب التى فيها حقنت النباتات أولاً بالفيرويد CSVd أو CEVd ثم بعد ذلك حقنت بالمتحدى ChCMVd كانت غير حاسمة بسبب أن الأعراض الناتجة عن ChCMVd لم يمكن تمييزها إيجابياً عن تلك المتوطدة مسبقاً والأعراض الأكثر شدة من الفيرويد CSVd والفيرويد CEVd. وبالتالى كما هو ملخص فى جدول ٢٢ فإن أفراد المجموعة من الفيرويدات التى تشمل السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة من PSTVd والفيرويد CEVd والفيرويد CSVd، ولكن باستثناء ChCMVd تظهر وقاية بالتضاد فى نوع من الأقحوان. هذا يدل على أن السلالة الشديدة والمعتدلة والفيرويد CEVd والفيرويد CSVd تؤثر على عمليات بيولوجية مشتركة، مع أنها تختلف معنويا من واحد إلى الآخر فى التركيب الأولى للأحماض RNAs.

أما الفيرويد ChCMVd يبدو أنه لا يؤثر فى نفس هذه العملية. ولتحديد فيما إذا كان المتحدى (الفيرويد المحقون ثانيا) له تأثير فى الوقاية بالتضاد أو يمكن أن يحمى النباتات عن طريق حقنة فى النباتات أولاً، فقد تم إجراء إختبارات حيوية فى تجربتين حفظت النباتات عن طريق الحقن المزدوج. فى كل حالة فإن كلا الفيرويدين حصل له تناسخ. فمثلاً الأعراض النموذجية لكل السلالة الشديدة والفيرويد CEVd (أو السلالة المعتدلة والفيرويد CEVd) لوحظت بعد الاختبار

الحيوى لمستخلصات الحمض النووى من النباتات المحفوظة والمحقونة مسبقاً بأى من إتحادات الفيرويدات. إن مستوى التناسخ بواسطة الفيرويدات المفردة فى النباتات المحفوظة بالتضاد والمحقونة مرتين تبقى لتحديدها.

خلال التجارب التى استمرت ٦٥ يوم لم يلاحظ اطلاقاً أعراض للفيرويد المتحدى المحقون فى نباتات الطماطم المحفوظة. وعلى أية حال، فى الأقحوان، فإن أعراض CEVd المتحدى المحقون لم تكبح بشكل غير محدود عن طريق الحقن المسبق بالسلالة الشديدة أو المعتدلة أو الفيرويد CEVd، وإنما بدأت فى الظهور فى هذه النباتات المحفوظة حوالى ٥٠ ـ ٦٠ يوم بعد الحقن بالمتحدى. هذه النتائج تشبه تلك التى حصل عليها Herrick & Cassells سنة ١٩٧٧ الذى درس الوقاية بالتضاد لسلالات فيرس موزايك الدخان.

لقد تم تفسير ظاهرة الوقاية بالتضاد فى الفيرويدات عن طريق تثبيت الإصابة بواسطة المحقون الأول سواء كان فيرس أو فيرويد والذى إلى حد ما يؤخر أو يمنع تعبيرات الأعراض عن طريق المتحدى المحقون فيرس أو فيرويد، ولا يمكن أن نلغى إمكانية أن مقدار التركيز للفيرويد المتحدى مطلوب لتعبيرات الأعراض وأن هذا التركيز لايصل إليه فى حالة وجود السلالة الواقية كنتيجة للتثبيط الجزئى للتناسخ.

إدخال فيرويد ثمرة الخيارة الباهتة فى التجربة:

أجريت التجربة السابقة مع إضافة فيرويد ثمرة الخيارة الباهتة CPFVd فى التجارب على الأقحوان. فتبين أن الأقحوان صنف Bonnie Jean تفاعل مع الإصابة بالفيرويد CPFVd بظهور بقع صفراء صغيرة عديدة على حواف الأوراق وقممها.

وقد أظهرت نتائج دراسات الوقاية بالتضاد أنه فقط ChCMV لم يحفظ نباتات الصنف Bonnie Jean ضد الإصابة بأى من الفيرويدات الثلاثة الأخرى، ولا أى من هذه الثلاثة فيرويدات حفظ هذه النباتات ضد الإصابة بالفيرويد ChCMV.

ومن ناحية أخرى فإن النتائج المذكورة فى جدول ٢٥ تدل على أن العزلتين من PSTVd بالإضافة إلى الفيرويد CSVd و CPFVd حفظت النباتات كل ضد الآخر. الحقن الرجعى للنباتات السليمة Bonnie Jean أكدت النتائج كما هو واضح فى الأعراض.

لم يكن بالإمكان رؤية RNA الخاص بالفيرويد ChCMVd على شكل حزمة على ال Polyacrylamide gels المحمل بمستخلصات من نباتات مصابة بالفيرويد ChCMVd حضرت بواسطة أى من الإجراءات المتبعة فى الاستخلاص، مع أن RNAs الخاصة بالنبات اكتشفت فى هذه المستلخصات عن طريق الصبغ بمادة Toluidine الزرقاء. إن حزم RNA لثلاثة فيرويدات الأخرى كانت دائماً موجودة فى وسط الجيل بالضبط فوق حزمة RNA - 9S. مهما كان فإن إجراءات المستخلص كانت تستعمل، أما حزمة m - PSTVd - RNA كانت دائماً الأكثر وضوحاً وكانت حزمة RNA للفيرويد CSVd كانت الأضعف. أما المستخلصات من نبات الأقحوان الصنف المزروع Mistletoe المحقونة بالفيرويد CPFVd لم تكن نقية بدرجة كافية نظراً لأن الجيل المحمل بهذه المستخلصات كانت تصبغ بشكل شامل بالتوليودين الأزرق.

جميع حزم RNA للفيرويدات كانت واقعة على نفس المسافة من قمة الجيل، هذا يدل على أنها لا تختلف فى حركتها فى الهجرة الكهربائية -Electrophoreti cal mobility فى ٥٪ بولى اكريلاميد جيل. يظهر فى جدول ٢٤ أن الفيرويد ChCMVd أصاب نبات الأقحوان فقط من الثلاثة أصناف المزروعة واحدث أعراض تبرقش الورقة النموذجية على الصنف Deep Ridge وعلى الصنف Bonnie Jean. أما الفيرويدات الثلاثة الأخرى أصابت جميع أنواع النبات المحقونة والمزروعة باستثناء نباتات الخيار صنف Sporu والتى كانت أصيبت فقط بالفيرويد CPFVd. نباتات الخيار المصابة نمت أبطأ من الأفراد السليمة، أوراقها كانت أصغر وشاحبة بأطراف مجعدة لأسفل، ازهارها كانت صغيرة ذات بتلات خشنة مثلمة وكانت ثمارها صغيرة شكل الكمثرى وذات لون أصفر باهت.

جدول ٢٤: تفاعل عدة نباتات إختبار للحقن بأربعة فيرويدات.

النبات المختبر	التفاعل مع الحقن بالفيرويدات				
	s-PSTVd	m-PSTVd	CSVd	CPFVd	ChCMV
١ ـ نبات الأقحوان					
صنف Bonnie Jean	ss	ss	ss	ss	ss
صنف Mistletos	ss	ss	ss	ss	ss
صنف Deep Ridge	si	si	si	si	ss
٢ ـ Gynura aurantiaca	ss	si	ss	si	0
٣ ـ نبات الخيار صنف Sporu	0	0	0	ss	0
٤ ـ الطماطم صنف Najwczesniejszy	ss	ss	ss	ss	0
الطماطم صنف New York	ss	ss	ss	ss	0
الطماطم صنف Rutgers	ss	ss	ss	ss	0
٥ ـ البطاطس صنف Line PW 22/70	ss	ss	ss	ss	0
البطاطس صنف Scopolia sinensis	lsss	lsss	lsss	si	0

ملاحظات على الجدول: ـ

ls = أعراض موضعية

ss = أعراض جهازية

si = إصابة جهازية بدون أعراض

o = بدون إصابة

جدول ٢٥ : نتائج إختبارات الوقاية بالتضاد مع أربعة فيرويدات على الأقحوان صنف Bonnie Jean.

الفيرويد الموجود فى اللقاح المضاف إلى النبات خلال		الأعراض الملاحظة على النباتات بعد ستة أسابيع من الحقن بالمتحدى
الحقن الأول	الحقن الثانى	
m - PSTVd	—	m - PSTVd
m - PSTVd	s - PSTVd	m - PSTVd
m - PSTVd	CSVd	m - PSTVd
m - PSTVd	CPFVd	m - PSTVd
m - PSTVd	ChCMVd	m - PSTVd + ChCMVd
s - PSTVd	—	s - PSTVd
s - PSTVd	m - PSTVd	s - PSTVd
s - PSTVd	CSVd	s - PSTVd
s - PSTVd	CPFVd	s - PSTVd
s - PSTVd	ChCMVd	s - PSTVd + ChCMVd
CSVd	—	CSVd
CSVd	m - PSTVd	CSVd
CSVd	s - PSTVd	CSVd
CSVd	CPFVd	CSVd
CSVd	ChCMVd	CSVd + ChCMVd
CPFVd	—	CPFVd
CPFVd	m - PSTVd	CPFVd
CPFVd	s - PSTVd	CPFVd
CPFVd	CSVd	CPFVd
CPFVd	ChCMVd	CPFVd + ChCMVd
ChCMVd	—	ChCMVd
ChCMVd	m - PSTVd	ChCMVd + m - PSTVd
ChCMVd	s - PSTVd	ChCMVd + s - PSTVd
ChCMVd	CSVd	ChCMVd + CSVd
ChCMVd	CPFVd	ChCMVd + CPFVd
none	m - PSTVd	m - PSTVd
none	s - PSTVd	s - PSTVd
none	CSVd	CSVd
none	CPFVd	CPFVd
none	ChCMVd	ChCMVd

خامساً: التداخل بين الفيرويدات المحقونة معاً:

Interference Between Coinoculated Viroids

أظهرت الدراسات المتأخرة أن الوقاية بالتضاد Cross - Protection تحدث فى الفيرويدات ليس فقط بين سلالتين لفيرويد معين (التى لا تختلف فى تتابعها الأساسى بأكثر من ١٠ ٪) ولكنها تحدث أيضاً بين الفيرويدات المختلفة وهذا أدى إلى إجراء تجارب كثيرة فى هذا المجال.

فى إختبارات الوقاية بالتضاد الكلاسيكية يكون هناك مدة أسبوعين بين الحقن بالفيرويد الأول والحقن بالفيرويد المتحدى. وحيث أن ظاهرة الوقاية بالتضاد تقترح بأن وجود فيرويد واحد يمكن أن يتدخل مباشرة مع عملية تناسخ الفيرويد الثانى، وبالتالى فإن هذا يصعب تقديره بعد فترة طويلة لأن فترة أسبوعين بين الحقن بالفيرويد الأول والفيرويد الثانى تسمح بحدوث تأثيرات ثانوية أخرى. وبالتالى فإن هناك مجموعتين من التجارب لتحديد فيما إذا كان التداخل يمكن أن يلاحظ بين الفيرويدات الداخلة فى النبات وكأنه لقاح واحد مخلوط من الفيرويدين.

عند البحث عن التداخل بين سلالة معتدلة من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس m - PSTVd وسلالة شديدة s - PSTVd. حقنت بادرات طماطم ذات عمر ١٤ يوم بكل من السلالتين على حدة ومرة ثانية بالسلالتين معاً. بعد ١٠ أسابيع أخذت ملاحظات وصور عن هذه النباتات. خلال فترة العشرة أسابيع هذه استعملت طريقتان لتقدير تعبيرات الأعراض للفيرويد PSTVd. حدد طول كل نبات أسبوعياً بواسطة قياس طول الساق حتى القمة المرستيمية. بالإضافة إلى ذلك استعمل نظام تدريج عددى واستعمل ثلاثة مرات فى الأسبوع ليسجل التغيرات غير العادية فى الشكل الظاهرى، مثل تشوه الأوراق، النموات الزائدة للسيقان

ملاحظة «هذه التجربة قام بها إثنى عشر باحثاً فى جامعة روكفلر فى أمريكا سنة ١٩٨٨ وكان على رأس هذا الفريق من الباحثين العالم ANDREA D.Branch، وهى تعرض هنا باختصار كبير».

المحورية، الشحوب، التبقع والموت والتقزم، هذا يعنى خفض المسافة بين السلاميات. التقديرات الممكنة على هذا المدرج تتراوح من صفر إلى خمسة. إن مقدار ٢ أو أكثر يدل على أعراض شديدة تدل على مرض فيرويدى شديد. هذه التجربة أجريت مرتين، باستعمال مجموعات معاملة تحتوى أربعة نباتات فى كل الأوقات. حصل على نتائج عالية التناسق ودرست المعلومات المتحصل عليها.

النباتات التى أعطيت لقاح مخلوط يحتوى ٠,٢ ميكوغرام لكل مللتر من السلالة المعتدلة من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس و ٠,٢ ميكوغرام لكل مللتر من السلالة الشديدة من نفس الفيرويد كانت نتائجها من حيث منحنى النمو والأعراض الجانبية مطابقة لتلك النباتات المحقونة بكمية ٠,٢ ميكوغرام لكل مللتر من السلالة الشديدة لنفس الفيرويد لوحدها. هذا يدل على إخفاق للسلالة المعتدلة فى أن تقلل التعبيرات المرضية للأعراض المتسببة عن السلالة الشديدة أما النباتات المحقونة بكمية ٠,٢ ميكوغرام لكل مللتر من السلالة المعتدلة نمت بسرعة أكثر ووصلت إلى طور نهائى أكبر من النباتات المحقونة إما بمخلوط من السلالة المعتدلة والشديدة معاً أو السلالة الشديدة لوحدها. وعلى كل حال فإن النباتات المحقونة بالسلالة المعتدلة يمكن أن تميز عن النباتات المحقونة بالكنترول على أساس الارتفاع وعلامات الشكل الظاهرى. النباتات المحقونة بعشرة أضعاف زيادة من السلالة المعتدلة فوق السلالة الشديدة (٠,٢ ميكوغرام لكل مللتر من السلالة المعتدلة و٠,٠٢ ميكوغرام لكل مللتر من السلالة الشديدة) كانت غير مميزة عن النباتات المحقونة بالسلالة الشديدة بتركيز ٠,٠٢ ميكوغرام لكل مللتر. وبالتالى حتى عندما يكون اللقاح محتوياً عشرة أضعاف زيادة من السلالة المعتدلة فإن العزلة الشديدة كانت سائدة سيادة كاملة على مستوى التعبير العرضى للمرض.

وعلى النقيض من ذلك فإن النباتات المحقونة بمائة ضعف زيادة من السلالة المعتدلة نمت إلى معدل ارتفاع أكثر قليلاً من المجموعة المشابهة المحقونة بالسلالة الشديدة لوحدها، هذه الزيادة لوحظت فقط فى فردين من المجموعة. نفس هذين

النباتين أظهرا أعراض معتدلة فقط خلال العشرة أسابيع فى فترة بعد الحقن. وعلى أية حال فى ٧٥٪ من النباتات فإن أعراضاً غير مخفضة من المرض الشديد قد نتجت على الرغم من زيادة مائة ضعف من اللقاح من RNA من العزلة المعتدلة لايوجد أى دليل على أن السلالة الشديدة والمعتدلة تسبب تأثيرات إضافية عند حقنهما معاً فى النباتات.

الجرعة المطلوبة لتعبيرات الأعراض:

هل من الممكن أن تلك الأعراض سوف تختلف ليس فقط مع السلالة ولكن أيضاً مع جرعة اللقاح؟؟. للإجابة على هذا السؤلا فإن مجموعات من النباتات الكنترول حقنت إما بالسلالة المعتدلة من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس لوحدها (بتركيز ٤,٠، ٢,٠، ٠,٠٢ و ٠,٠٠٢ ميكوغرام / مللتر) أو بالسلالة الشديدة لوحدها (فوق نفس المستوى المستوى من التركيز) ثم وضعت تحت المراقبة لمدة عشرة أسابيع. وجد أن الوقت اللازم لبداية ظهور الأعراض الفيرويدية النموذجية يتناسب عكسياً مع تركيز اللقاح. وعلى أية حال فإن هذا التأثير الذى كان أكثر وضوحاً خلال أول أسبوعين بعد الحقن لم يستمر. بمضى عشرة أسابيع بعد الحقن فإن جميع المجموعات النباتية المحقونة بالسلالة المعتدلة مطابقة تماماً لبعضها البعض بغض النظر عن التركيزات التى استعمل فيها اللقاح، سواء حقنت بتركيز ٠,٤ ميكوغرام لكل مللتر أو ٠,٠٠٢ ميكوغرام لكل مللتر فهى تعبر عن نفس المستوى من أعراض السلالة المعتدلة وكانت كلها أقصر قليلاً من نباتات الكنترول المحقونة بالمنظم. وبالمثل فإن النباتات المحقونة بتركيز ٠,٠٠٢ ميكوغرام لكل مللتر من السلالة الشديدة أظهرت نفس الخفض العنيف فى الدرجة وحصلت على نفس الأعراض مقدرة مثل تلك المحقونة بتركيز ٠,٤ ميكوغرام. فى كل حالة فإن الأعراض الخاصة المميزة للسلالة وجد أنها تتكشف فى النباتات المحقونة بمدى جرعات من الفيرويد متفاوتة وإن إختلاف التركيز فى الحقن يظهر تأثير فى أول ٧٠ يوم ثم بعد ذلك لا يعود لاختلاف التركيز أى أثر على الأعراض.

تثبيط تناسخ فيرويد تقزم حشيشة الدينار بعد الحقن المشترك بفيرويد PSTVd :

نظراً لأن عزلات الفيرويد تحدث طبيعياً، مثل العزلة المعتدلة والشديدة لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس، فإنها يمكن أن تحتوى خليطاً من تنوعات التتابع. إن هذه الدراسة إمتداداً للدراسة السابقة وذلك لمقارنة كفاءة التناسخ فى النباتات المحقونة بنسخ من تتابع فيرويد مكلون. هذه النسخ ممكن أن تزود بلقاح يحتوى تتابعات نقية مفردة.

لقد إختير فيرويد تقزم حشيشة الدينار HSVd وفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd لهذه التجربة لعدة أسباب منها:ـ

١ ـ هذان الفيرويدان يحدثان أعراضاً مختلفة جداً فى نباتات الطماطم.

٢ ـ الإصابة بفيرويد تقزم حشيشة الدينار تسبب أعراضاً غير ظاهرة فى البطاطس بينما فيرويد الدرنة الغزلية الهولندية يسبب أعراضاً شديدة جداً تحت ظروف النمو المستعملة فى التجربة.

٣ ـ نظراً لأن الفيرويدين يمتلكين تماثل تتابع محدود فقط فمن الممكن تمييزهما بطريقة تهجين الحمض النووى.

٤ ـ إن نسخ ال Dimeric من HSVd و PSTVd قد تبين أنها معدية فى نباتات الخيار والطماطم بالترتيب.

لإختبار نسخ ال HSVd dimeric على نباتات الطماطم، فإن cDNA inserts كانت قد تحركت أولاً فى ناقلات التعبير pSP6. إثنان من البلازمد مختلفان كل من تكرار ترادفى رأس مع ذيل من HSVd cDNA ركبت فى pSP6 واحداً يستعمل موقع Eco R1 الموجود فى HSVd DNA والآخر مستعملاً مواقع Bam H1. النسخ من هذه البلازميدات يشار إليها HSD3 و BH2 بالترتيب

تحتوى HSVd dimers من القطبية الموجبة محاطة جانبياً بمناطق قصيرة من تتابعات الناقل.

إن تهجين الحمض النووى قد بين أن تناسخ HSVd يحدث فى نباتات الطماطم المحقونة بكل من النسختين HSVd dimeric. وعلى أية حال كما هو متوقع فإن هذه النباتات لم يتكشف عليها أية أعراض يتعرف عليها. إن نسخة ال PSTVd 8A قد أظهرت فى تجارب سابقة أنها معدية لنباتات الطماطم، هذا يكون باعثاً على نضج أل PSTVd RNA الدائرى لتتابع الهولندى. إن الحقن بـ 8A أنتج أعراضاً مميزة لمرض فيرويدى شديد. المقارنة بـ dot intensities بين أن نباتات الطماطم المصابة بفيرويد PSTVd يتجمع فيها على الأقل ٥٠ ضعف من RNA الفيرويدى أكثر منه فى نباتات الطماطم المحقونة بفيرويد HSVd.

هناك إجراءان مختلفان إستعملا للحقن المشترك للنباتات بفيرويد HSVd وفيرويد PSTVd. فى تصميم مشابه لذلك المستعمل فى دراسة السلالة المعتدلة والشديدة فى فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس فإن نسخاً من ال Dimeric من HSVd و PSTVd خلطت مع بعضها بمعدلات مختلفة وحقنت فى بادرات الطماطم. فى التجربة الثانية، فإن نسخاً مزدوجة حضرت والتى تحتوى صورتين (نسختين) من ال PSTVd إرتبطت مع صورتين من HSVd. هذه النسخةBPH 21 ضمنت إضافة التتابعات من HSVd و PSTVd بتركيزات متساوية. كانت النتائج من كلا التجربتين متشابهة بغض النظر عن التصميم. إن وجود ال PSTVd كان مقترناً بخفض ملحوظ فى تناسخ ال HSVd.

فى تجارب أولية للتنافس بين HSVd و PSTVd فإن نسخاً من HSD_3 و 8A خلطت بمعدلات بنسبة تتراوح من ١ : ١ إلى ١٠٠ : ١. النباتات التى تحصل على نفس اللقاح كانت تعامل كمجموعة. بالمقارنة مع عينات من النباتات حقنت بنسخاً من HSVd لوحده، فإن التركيز من HSVd كان يخفض بالتدريج فى الأحماض النووية من النباتات المحقونة بـ HSVd و PSTVd بنسبة ١ : ١. لوحظ بعض الخفض فى HSVd فى مستخلصات من النباتات حقنت بعشرة

أضعاف زيادة من نسخ HSVd، بينما نسخ ال PSTVd لم يكن لها تأثير مكتشف على التجمع فى النباتات المحقونة بمائة ضعف زيادة من نسخ HSVd.

لتحديد فيما إذا كان المستوى المنخفض من HSVd عاكساً عدم المقدة النسبية على نسخ ال HSVd لتدخل خلايا الطماطم فى الوقت الذى عنده يضاف اللقاح، النباتات كانت أيضاً محقونة بنسخة مزدوجة (BPH 21) محتوية صوراً مرتبطة من ال Dimeric لكل من HSVd و PSTVd. وعلى أية حال فإن تناسخ HSVd لم يثبت فى النباتات التى أخذت هذه النسخة. فى الحقيقة، فإن سبعة أسابيع بعد الحقن خلالها لم يمكن اكتشاف HSVd فى الساق ومستخلصات الورقة فى هذه النباتات. فى التجارب اللاحقة فإن محتويات الفيرويد فى النباتات المفردة كانت قد تحددت.

إن طريقة Dot hybridization أظهرت أن واحداً فقط من ثمانية نباتات يتجمع فيها مستويات ممكن التعرف عليها منHSVd RNA عندما حقنت بمخلوط محتوياً ٢٠ ميكوغرام لكل مللتر من HSD_3 و ٢,٠ ميكوغرام لكل مللتر من نسخ Dimeric PSTVd. ومن ناحية أخرى فإن ثلاثة من أربعة نباتات تنسخ HSVd عندما حقنت بـ HSD_3.

إن كفاءة ال PSTVd فى وقف تناسخ ال HSVd كان أيضاً مؤكداً فى النباتات المحقونة بمقدار ٤٠ ميكوغرام لكل مللتر من النسخة المزدوجة، BPH 21. هذه النباتات أظهرت أعراض مرض شديدة يتعذر تمييزها عن تلك الناتجة بواسطة الحقن بنسخة ال PSTVd لوحدها. إن الفيرويد PSTVd يتجمع فى الخمسة نباتات كلها، بينما HSVd لم يمكن اكتشافه فى أى منها. إن النسخة من-HSVd dimer-ic أكثر تشابهاً للنسخة المزدوجة التى تسمى BH_2. هذه النسخة تصيب ثلاثة من خمسة نباتات عندما حقنت بمقدار ٢٠ ميكوغرام لكل مللتر. كذلك فإن BH_2 تصيب ثلاثة من خمسة نباتات عندما حقنت بمقدار ٥٠ ميكوغرام لكل مللتر. إن إصابة ٦ من ١٠ نباتات طماطم محقونة بمقدار ٢٠ ــ ٥٠ ميكوغرام لكل مللتر من BH_2 أدى إلى الاقتراح بشدة بأن HSVd فشل فى التناسخ فى النباتات المحقونة بنسخة مزدوجة من BPH 21 بسبب التداخل من PSTVd.

يمكن القول باختصار بأن هذه التجربة قد أظهرت أن نسخاً من PSTVd قد خفضت بشكل كبير جداً حيوية نسخ HSVd. إن طريقة Dot hybridization قد أظهرت أن الفيرويد PSTVd فقط هو الذى يتضاعف وينسخ إلى مستويات يمكن اكتشافها فى النباتات المحقونة بنسخ مزدوجة تحتوى نسختين من PSTVd متبوعة بنسختين من HSVd. بينما النسخ المزدوجة التى فيها HSVd تتابعه يسبق تلك التى فى PSTVd التى تحتاج إلى الإختبار. لقد تبين أن نسخ HSVd تكون معدية عندما تحاط بمدى واسع من التتابعات المختلفة. ويبدو أن HSVd يفشل فى التضاعف عندما يحقن مشتركا مع PSTVd فى النباتات بسبب التداخل الواضح من PSTVd.

هناك سؤالاً نحتاج إلى الإجابة عليه مستقبلا وهو هل الفيرويدات الشديدة المرضية تستطيع أن توقف تناسخ الفيرويدات الأقل شدة مرضية؟؟

إن تجارب الحقن المشترك تختلف عن تجارب الوقاية بالتضاد Cross - Protection والتى فيها إحدى الفيرويدات يدخل النبات قبل الآخر بمدة معينة. إذا كان تناسخ الفيرويد يؤدى إلى تكوين تركيب معقد دائم فإن هذا التركيب يكون منافساً للفيرويد الثانى الذى يدخل متأخراً. أما فى تجارب الحقن المشترك فإن الفيرويدين يدخلان معاً مما يسمح لهما بفرصة متساوية، هذه الأوضاع تجعل الفيرويد الشديد يكون عنده فرصة كبيرة لتكوين معقد بغض النظر عن وجود الفيرويد الضعيف.

لقد وجد أن تناسخ PSTVd فى النباتات الحساسة جداً للبرد والتى تنمو على درجة أقل من ٢٤ْم يكون قليل جداً مما يؤدى إلى تثبيط واضح فى الأعراض المرضية وفى تراكم الفيرويد فى النبات. كذلك فإن مستويات HSVd فى نباتات الطماطم النامية فى نفس درجات الحرارة كان أقل منه فى PSTVd. وأن طرق التحاليل المختلفة أثبتت أن مستويات HSVd لا تزيد عن ٢ ٪ من مستوى PSTVd. إن الاختلاف فى هذا المستوى يؤدى إلى الاختلاف فى إظهار الأعراض المرضية على نباتات الطماطم.

مراجع خاصة بالفصل الرابع

1 - Bachmann, B., Luke, W. and Hunsmann, G. 1990. Nucleic Acid Res. 18 : 1309.

2 - Cassells, A. C. and Herrick, C.C. 1977. Virology 78 : 253 - 260.

3 - Fernow, K. H. 1967. Phytopathology 57 : 1347 - 1352.

4 - Hecker, R. et al. 1988. Gene 72. 59 - 74.

5 - Loss, P., Schmitz, M., Steger, G. and Riesner, D. 1991. EMBO J. 10 : 719 - 727.

6 - Matousek, J, Trnena, L. Rakousky, S. ad Riesner, D. 1994. J. Phytopa., 140 : 10 - 24.

7 - Mellor, F. C. and R. Stace - Smith. 1977. Applied and Fundemental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer Verlag, Berlin.

8 - Melton, D. A. et al 1984. Nucl. Acids. Res. 12 : 7045 - 7056.

9 - McKinney, H. H. 1929. I. Agric. Res. 39 : 557 - 578.

10 - Palukaitis, P. 1987. Virology, 158 : 239 - 241.

11 - Riesner, D. et al. 1989. Electrophoresis 10, 377 - 389.

12 - ____, ____ , ____ .1990. New Series in biophysics. Nucleic Acids Vol IV PP. 194 - 243.

13 - Steger, G. et al. 1992. J. Mol. Biol. 227 : 719 - 737.

14 - Tsagris, M., Tabler, M. ad Sanger, H. L. 1991. Nucleic Acid Res. 19 : 1605 - 1612.

15 - Wassengger, W. J. et al. 1994. Cell. 76 : 267 - 276.

الجزء الثانى

الأمراض الفيرويدية

Viroid Diseases

الفصل الخامس

الأمراض الفيرويدية المتسببة عن مجموعة PSTVd

فيرويدات من تحت مجموعة B_1PSTVd

١ ـ فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس ـ مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس

Potato spindle tuber viroid

ينتشر مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس فى كل من الولايات المتحدة الأمريكية، كندا، روسيا، جنوب أفريقيا، الهند واستراليا. يسبب المرض خسائر كبيرة فى بعض المناطق ويعتبر أحد أكثر الأمراض المهلكة للبطاطس. يهاجم المرض معظم الأصناف وينتشر بسرعة وفى كثير من الحالات يكون مترافقا مع بعض الأمراض الفيروسية. يهاجم المرض الطماطم ولكن يبدو (إقتصاديا) أنه ذو أهمية قليلة على محصول الطماطم.

الأعراض:

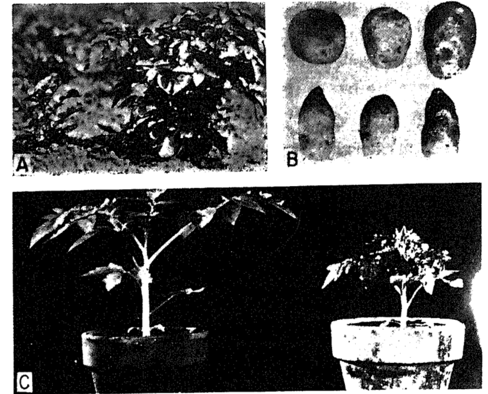
تظهر نباتات البطاطس قائمة ومتقزمة، الأوراق والفروع الجانبية تنمو على زاوية حادة، قواعد الأوراق تكون منحنية كالمنجل ويلاحظ نكروزز على حواف ونصل الورقة. تكون الأوراق صغيرة وقائمة والوريقات تكون ذات لون أخضر غامق وأحياناً يظهر عليها إلتفاف والتواء (شكل ٣٩).

تكون الدرنات متطاولة ذات شكل مغزلى نموذجى أو تأخـذ شكل المضرب doll - Shaped ، أحياناً تكون الدرنات ذات منتصف أسطوانى ونهايات وتدية وتكون الدرنات أكثر نعومة وذات جلد أكثر ضعفاً وتتشقق أحياناً وتكون ذات لحم رهيف طرى. تكون عيون الدرنة أكثر عدداً وأكثر وضوحاً إلا أنها تكون منخفضة قليلاً، تكون الدرنات مشوهة. ينخفض الانتاج إلى حد كبير يصل ٢٥ ٪ فأكثر، ينخفض عدد وحجم الدرنات الناتجة كثيراً، بعض النباتات لا تعطى درنات أبداً.

أما نباتات الطماطم القابلة للإصابة فتكون متقزمة وتتدلى الأوراق وتكون ذات عروق غائرة أكثر منه فى الحالة الطبيعية مع وجود نكروزز (موت وتحلل الأنسجة) فى الأعناق والعروق ونصل الورقة. تكون نباتات الطماطم المصابة ذات قمة متوردة.

تكون الأعراض أكثر وضوحاً وشدة عندما تنتج عن السلالة الشديدة. كذلك تكون الأعراض أكثر وضوحاً فى طور الإصابة الثانى (الإصابة الثانوية) حيث تلتحم الأوراق السفلى أحياناً. فى بعض الظروف الجوية وفى بعض الأصناف تكون الأعراض الناتجة عن الإصابة بالسلالة الشديدة شبيهة لتلك المتسببة عن السلالة المعتدلة، ولكن أعراض السلالة الشديدة تتميز بوضوحها وشدة إنتشارها.

إختبر نشاط أنزيمات الببتايديز فى نباتات الطماطم السليمة والمصابة بالفيرويد PSTVd فوجد أن Leu - P - nitroanilide كانت حوالى ثلاثة أضعاف نشاطها وسبعة أضعاف كميتها فى النباتات المصابة عنها فى النباتات السليمة وإن كمية الأملاح، الكبريت، الكلور، الكالسيوم، الزنك والمنغنيز أعلى فى النباتات المصابة عنها فى السليمة أما المغنيسيوم والنحاس والفسفور والالمنيوم والسلكون فلم تتأثر بالإصابة.



شكل رقم ٣٩ :

أعراض متسببة بواسطة فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس. (A) نباتات بطاطس مريضة على الشمال متقزمة ونموها قائم. (B) درنات مريضة، فى الأسفل مغزلية الشكل وصغيرة مقارنة بالدرنات السليمة العلوية. (C) نباتات طماطم على الشمال سليمة وعلى اليمين مريضة بعد عشرون يوم من الحقن بفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس.

الكائن الممرض :

يتسبب هذا المرض عن فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس-Potato Spindle Tuber Viroid ويكتب باختصار (PSTVd) وقبل سنة ١٩٩٣ كان يكتب (PSTV)، إلا أن علماء الفيرويد إتفقوا على إضافة حرف (d) وذلك لتمييزه عن الفيروسات حيث أن الفيرويدات المكتشفة أصبحت كثيرة. تصنيف الفيرويد مذكور فى الجزء الأول من الكتاب.

هذا الفيرويد هو أول فيرويد عرف وحددت نيوكليتيداته وقد درس دراسة وافية جداً وإن جميع دراسات الفيرويدات كانت تطبق على هذا الفيرويد. إبتدأت الأبحاث على هذا الفيرويد من قبل العالم Diener سنة ١٩٧١ حيث أن العالم Diener هو الأب الروحى لعلماء الفيرويد وإن فيرويد PSTVd هو الأب الروحى فى دراسات الفيرويدات كلها.

الفيرويد هو RNA معدى وهو ذو وزن جزيئى منخفض حوالى ١٠٠٠٠٠ دالتون. إن RNA لهذا الفيرويد يتكون من ٣٥٩ نيوكليتيدة (ذكر بعض العلماء أن سلالات من هذا الفيرويد تكون ٣٥٦ وسلالات أخرى ٣٦١) به عديد من القواعد المزدوجة. يتكون الفيرويد من خيط مفرد من RNA مستقيم أو دائرى. يظهر الفيرويد النقى بتصوير الميكروسكوب الالكترونى على شكل خيط قصير طوله ٥٠ نانوميتر وله سمك يماثل سمك DNA مزدوج الخيط (شكل رقم ١ فى الجزء الأول من الكتاب).

تبقى العصارة المأخوذة من النباتات المصابة قادرة على إحداث العدوى بعد تخفيف ١ : ١٠٠ و ١ : ١٠٠٠. وكذلك يحتفظ بحيويته عند تسخين المستخلص النباتى لمدة عشرة دقائق على ٧٥ ـ ٨٠°م. إن الفيرويد سريع التثبيط فى العصارة المستخلصة من النباتات المصابة، ولكن يمكن إبقاء قدرته على إحداث العدوى عن طريق معاملة العصارة بالفينول حيث أن الفينول يثبط نشاط أنزيم Ribonuclease الذى يحطم RNA الفيرويدى.

الانتقال:

ينتقل الفيرويد ميكانيكياً وينتشر بشكل أساسى بواسطة السكاكين المستعملة فى تقطيع التقاوى للبطاطس السليمة والمصابة، وأثناء العمليات الزراعية وطرق الجمع. كذلك ينتقل الفيرويد عن طريق حبوب اللقاح والبذور الحقيقية وعن طريق عديد من الحشرات من ضمنها المن، نطاطات الأعشاب. يبدو أن النقل بالحشرات غير أساسى لهذا الفيرويد.

أشكال الفيرويد PSTVd:

كما هو معروف فإن الفيرويدات هى مخلوقات ممرضة ذات وزن جزيئى منخفض تتكون من جزئ RNA دائرى مغلق احادى الخيط. إن لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس شكلان الأول مستقيم والثانى دائرى. أفادت كثير من الأبحاث بأن الشكل المستقيم من RNA الفيرويدى له نفس العدوى التى تتسبب عن الشكل الدائرى من RNA الفيرويدى. ووجد أيضاً أن الشكل المستقيم له ثبات أقل منه فى الجزيئات الدائرية. كذلك فإن الأشكال المستقيمة تحتوى-5` - Phosphate وبالتالى فإن كثيراً منها لم تكن منتجة بواسطة أيونات معدنية كعامل مساعد للهيدرولسز من الجزيئات الدائرية. والشكل المستقيم يتكون من تجمع يحتوى أى واحدة من أربعة نيوكليتيدات على نهايتها `5. مثل هذه المعلومات تدل على أن الجزيئات المستقيمة الطبيعية لم تنتج بواسطة إنشطار الجزيئات الدائرة عند موقع نيوكليتيدة محدد، ولكن يمكن أن تنتج إما بواسطة الإنشطار العشوائى أو بواسطة الإنشطار ضمن مناطق خاصة فى الجزئ الدائرى مختلف القابلية لأنزيم Nuclease.

لقد عزلت الأشكال الدائرية والمستقيمة من هذا الفيرويد ونقيت من نسيج نبات طماطم مصاب بالفيرويد PSTVd وإن كلا الشكلين فى حد ذاتهما لم يمكن تمييزهما بالميكروسكوب الألكترونى ولكن إلى حد ما يمكن تمييزهما عن طريق electrophoretic mobilities على Denaturing Polyacrylamide gels وعن طريق مقدرة الشكل المستقيم وليس الدائرى بأن يحدث له فسفرة على موقع نهاية `5 بواسطة (γ - P^{32}) ATP و T_4 - Polynucleotide Kinase. ولقد أمكن إثبات أن الفيرويد PSTVd يمتلك هذين الشكلين أيضاً عن طريق تحليلات التهجين والحيوية. ويبين جدول رقم ٢٦ أن كلا الشكلين من الفيرويد لهما نفس الحيوية والكفاءة فى إصابة نباتات الطماطم وكذلك لهما أيضاً نفس الحيوية فى إصابة **Gynura aurantiaca**.

جدول ٢٦ : يبين حيوية الشكل المستقيم والدائرى لفيرويد PSTVd على نباتات الطماطم.

شكل الفيرويد المختبر	عدد النباتات التى يظهر عليها أعراض على عدد النباتات المحقونة بتركيز من RNA نانوغرام / مللتر							
	٥٠	١٠	٥	١	٠,٥	٠,١	٠,٠١	٠,٠٠١
فيرويد دائرى	5/5	4/4	5/5	3/5	2/5	1/5	1/5	-
فيرويد مستقيم	5/5	2/3	3/5	2/5	3/5	1/5	0/5	-
فيرويد دائرى	-	6/6	-	3/6	-	0/5	0/5	0/6
فيرويد مستقيم	-	6/6	-	3/6	-	0/5	0/5	0/6

من الأبحاث المتلاحقة والمتكررة فى هذا الموضوع تبين أن الشكل المستقيم للفيرويد من المحتمل أن يكون مرتبطاً فى الطبيعة مع الشكل الدائرى وأن عملية الربط هذه تكون فعالة نسبياً. أجريت دراسات كثيرة لمعرفة تأثير الطرق المختلفة فى تحضيرالفيرويد واستخلاصة على تكوين الشكل المستقيم للفيرويد. ونظراً لأن كلا الشكلين الدائرى والمستقيم قد وجدا فى الأنسجة المستخلصة بأى طريقة من طرق الاستخلاص الأربعة، فإن هذا يدل على أن الأشكال المستقيمة توجد بذاتها وأن وجودها لم يكن صناعياً نتج من تأثير أى واحد من تلك الإجراءات. زيادة على ذلك فإن وجود الأشكال المستقيمة لم يكن معتمداً على نوع العائل الذى يتناسخ فيه الفيرويد ولا على طول المدة التى يبقى فيها النسيج مصاب ولا على استعمال سلالة معينة من PSTVd فى اللقاح. ولقد تبين أن الشكل المستقيم يزداد تجمعه فى الأنسجة بزيادة وقت التحضين ويصبح مساوياً لمستويات الشكل الدائرى من الفيرويد بعد ٢٤ ساعة من التحضين. يلاحظ ذلك فى جدول ٢٧ .

جدول ٢٧ : تأثير طول مدة التحضين على تجمع الشكل الدائرى والمستقيم من فيرويد PSTVd فى خلايا نسيج نبات البطاطس.

طول فترة التحضين بالفسفور المشع	٪ شكل دائرى	٪ شكل مستقيم
٤ ساعة	٧٧	٢٣
١٢ ساعة	٦٥	٣٥
٢٤ ساعة	٤٦	٥٤

وهناك تجارب تدل نتائجها على أن جزيئات الشكل الدائرى والمستقيم كل منها يبقى منفرداً أو أن جزيئات الشكل الدائرى تبنى أولاً ثم بعد ذلك تتجمع جزيئات الشكل المستقيم كنتيجة لإنشطار الجزيئات الدائرية، ولكن على أية حال فإن المستوى الكلى للشكل المستقيم نادراً ما يساوى مستوى الشكل الدائرى ولا يكون أعلى منه. عند استعمال أنزيم RNA ligase يمكن أن يحدث توازن بين المستويين.

ولقد ثبت أيضاً بإن معظم الجزيئات المكونة لتجمعات الشكل المستقيم ليست هى الفيرويد المستقيم طبيعياً ولكنها ناتجة من الإنشطار الذاتى من أشكال ال multimeric على مواقع محددة وتتجمع قبل أن يتم اللحام إلى أشكال دائرية. هناك مستوى منخفض من النسبة المئوية لـ G ومستوى على من U فى الشكل المستقيم.

هناك عدة ملاحظات تدل على أنه ليست عروة اليد اليمنى هى الموقع الفريد للإنشطار ذلك للأسباب الآتية:ـ

١ ـ هناك ٧٪ من جزيئات الشكل المستقيم تحتوى 5`- terminal G residue.

هذه النيوكليتيدة ليست موجودة فى عروة اليد اليمنى من الشكل الدائرى.

٢ ـ إن عدداً من ال minor spot موجودة فى طريقة تحليل بصمة الإصبع فى الشكل المستقيم وغير موجودة فى الشكل الدائرى.

٣ ـ الخمسة بقع التى تمثل عروة اليد اليمنى من الفيرويد (بصمة الإصبع) تظهر معلمة بدرجة عالية أكثر مما يتوقعه الباحث أن توجد فى الجزيئات المتشكلة بواسطة الإنشطار العشوائى.

٤ ـ عند التحليل فإن البقع المتعلقة بمجموعة النيوكليتيدات القصيرة أو الطويلة والتى من المتوقع أن تكون ضمن عروة اليد اليمنى التى فى أجزاء من RNase T_1 تكون غير واضحة فى التحليل.

٥ ـ إن الأجزاء المحتوية RNase T_1 فى ذراع اليد اليمنى والعروة تكون موجودة فى بصمة الإصبع للشكل المستقيم.

يمكن القول بأن نهاية ساق اليد اليمنى وعروة الشكل الدائرى تحتوى تتابع يشبه تتابع بروموترجين rDNA. وبالتالى يمكن القول بأن RNA Polymerase I المعتمد على DNA يمكن أن يتدخل فى بناء الفيرويد.

هناك مواقع أخرى للإنشطار فى PSTVd حددت بتفاعلات كثيرة وتبين أن مواقع الإنشطار هى ١٧٧ ـ ١٨٢، ١١٣ ـ ١١٤، ٨٠ ـ ٨١، ٣٣٤ ـ ٣٤٠، ٣٠٠ ـ ٣١٢، ٢٧١ ـ ٢٧٥.

حركة المسبب فى النبات:

إن ظاهرة إنتقال الفيروسات مسافة طويلة خلال اللحاء فى النباتات المصابة قد درست بتعمق ولقد تأكد بأنها عملية موجبة تقع فعلاً. أما ظاهرة إنتقال

الفيرويدات لمسافة طويلة فى النباتات المصابة هى أيضاً تكون خلال اللحاء، مع أن هذا الموضوع قد حصل على قليل من الاهتمام.

كما نعرف فإن الفيرويدات هى جزيئات من RNA معدية ذات وزن جزيئى منخفض أحادية الخيط مكونة دوائر مغلقة ذات درجة عالية من تزاوج القواعد الداخلية. ولقد وجد أن هذه الفيرويدات تتحرك من الساق المحقون أو الورقة المحقونة إلى المناطق المرستيمية فى النبات، عندئذ تكون الخلايا فى جميع الأوراق الحديثة أصبحت مصابة خلال تكشفها.

فى هذا المجال أجريت تجاب على إنتقال الفيرويد PSTVd لتحديد سيره فى نباتات الطماطم وتبين أن الفيرويد يتحرك لمسافة طويلة عن طريق اللحاء وبالتالى فإنه يشابه فى هذا المجال حركة الفيرس.

عند الحصول على مستخلص حمض نووى منقى جزئياً من نباتات طماطم مصابة بالفيرويد PSTVd ثم يخفف فى ٠,١ مول Na_2HPO_4 ثم يحقن (فى أعلى وريقة من الساق) لأول ورقة حقيقية من أوراق بادرات الطماطم ثم تحضن النباتات على درجة ٣٠°م ثم يكشف عن وجود الفيرويد على فترات متباعدة فى أجزاء مختلفة من النبات بطريقة Dot - blot - hybridization.

ولقد تبين أن الفيرويد PSTVd يمكن أن يكتشف أولاً فى قمم الأفرع وفى ورقة فوق الورقتين اللتين تقعان فوق الورقة المحقونة وذلك بعد سبعة أيام من الحقن. وفى تجربة أخرى حيث الأوراق إختبرت للكشف عن الفيرويد بعد ٣، ٦، ٩ و ١٢ يوم من الحقن، فقد أمكن اكتشاف الفيرويد فى القمم بعد ستة أيام من الحقن. ومن المهم أن نذكر هنا أن الورقة الواقعة فوق الورقتين اللتين تقعان فوق الورقة المحقونة أصبحت جزء من قمة الفرع فى النبات بعد ١ ـ ٤ أيام من الحقن. وبالتالى فإن الفيرويد PSTVd يتضاعف إلى مستوى يمكن اكتشافه فى القمة أكثر منه فى الأوراق الأخرى. بعد ١١ يوم من الحقن يمكن اكتشاف الفيرويد فى

الورقة الموجودة فوق الورقة المحقونة. وبعد ٢ ـ ٤ أسابيع يمكن أن يكتشف فى الورقة المحقونة نفسها. لقد سبب الفيرويد ظهور أعراض فى نباتات الطماطم بعد أسبوعين من الحقن. إن الوريقات المحقونة لم تختبر روتينياً لأن اللقاح المتبقى فى الوريقات يمكن أن يكتشف بعد خمسة أيام من الحقن. وبعد ثلاثة أسابيع من الحقن أمكن اكتشاف الفيرويد فى جميع الوريقات فى الورقة المحقونة.

إن إنتشار الفيرويد PSTVd فى أوراق بادرات الطماطم المحقونة (ثلاثة إلى أربعة طور ورقى) قد تحدد بعد شهر من الحقن. النباتات التى فيها الورقة الثالثة فوق الفلقات كانت قد حقنت أظهرت وجود الفيرويد فى الجذور، فى الورقة المحقونة وفى جميع الأوراق الواقعة فوق الورقة التى حقنت، ولكن ليس فى الورقتين الموجودتين تحت الورقة المحقونة. ومن ناحية أخرى فإن النباتات التى فيها الورقة الأولى فوق الفلقات كانت قد حقنت، أظهرت وجود الفيرويد فى جميع الأوراق بالإضافة إلى الجذور. من الدراسات السابقة يمكن القول بأن:ـ

١ ـ إن الفيرويد PSTVd عنده المقدرة على أن يتحرك من الورقة المحقونة واصلاً إلى قمة الفرع فى النبات ويتضاعف إلى مستويات يمكن اكتشافه فى حدود ستة أيام بعد الحقن.

٢ ـ إن الفيرويد PSTVd يكتشف أولاً فى قمة الفرع وفى الأوراق المجاورة للقمة، ثم بعد ذلك فى الأوراق الأخرى بين الورقة المحقونة وقمة الفرع وفى الأوراق الملاصقة له وأخيراً فى الورقة المحقونة نفسها.

٣ ـ الفيرويد PSTVd غير قابل للاكتشاف فى الأوراق تحت الورقة المحقونة.

هل الفيرويد يسير خلال اللحاء؟؟

نظراً لأن نواتج عملية التمثيل الضوئى تسير فى اللحاء وتنتقل من الأوراق الكاملة الإنفراد إلى أعلى حيث تصل الأوراق الحديثة التكشف وإلى قمة الفرع ثم إلى أسفل إلى الجذر، ونظراً لأن هذه الأنسجة هى التى يمكن أن يكتشف فيها

فيرويد PSTVd فى الأوقات المبكرة، فقد أجريت تجربة لتنظيم حركة الفيرويد عن طريق إعادة توجيه سير نواتج عملية التمثيل الضوئى وهذه التجربة كالآتى:-

ظللت ورقة تحت الورقة المحقونة فى وقت الحقن فى ستة نباتات وذلك لتوجيه سير نواتج عملية التمثيل الضوئى فى هذه الورقة. بعد ٢٠ و٢٣ يوم من الحقن إختبرت أوراق من كل من الثلاثة نباتات وجمعت وإختبرت بإختبار- Dot - blot hybridization. وعلى النقيض من نتائج التجارب التى أجريت على الأوراق غير المظللة، فإن الأوراق المظللة تحتوى PSTVd ولكن الأوراق التى تحت الأوراق المظللة لا تحتوى فيرويد. وبالتالى فإن تظليل الأوراق التى تحت الأوراق المحقونة لم يمنع الفيرويد من إختراق إما قمة الفرع أو الأوراق التى فوق تلك الأوراق المحقونة وهذا يؤدى إلى حركة الفيرويد فى الاتجاه السفلى مع نواتج التمثيل الضوئى.

عندما ظللت الأوراق المحقونة لم يكن هناك فيرويد يمكن اكتشاف حركته إلى أسفل، بينما على فترات زمنية من الإختبار فإن حركة الفيرويد فى الأوراق بين القمم والأوراق المحقونة قد تأخر عندما كانت الأوراق المحقونة مظللة. كذلك فإن تغطية الأوراق المحقونة والتى تؤدى إلى وقف حركة نواتج التمثيل الضوئى فى هذه الأوراق أيضاً أدت إلى تأخير دخول الفيرويد فى الجهاز الوعائى فى النبات بالإضافة إلى تأخير تكاثر الفيرويد فى الأوراق المحقونة. هذا الأخير يمكن أن يعزى إلى المستوى المنخفض فى النشاط التمثيلى فى مثل هذه الأوراق.

مع أن الفيرويد ينتقل إلى أسفل ويصل الجذور بالإضافة إلى إنتقاله إلى أعلى ويصل القمة النامية، فإن تأثير تظليل أوراق مختلفة فى النباتات المحقونة على حركة الفيرويد فى نسيج الجذر لم تختبر، بينما حركة الفيرويد إلى الجذور تكون متعارضة مع قلة الحركة فى الأوراق التى تحت الورقة المحقونة. هذا يتفق مع نظام حركة نواتج التمثيل الضوئى فى اللحاء من الأوراق كاملة الانفراد إلى الأوراق المتكشفة فى الجزء العلوى من النبات وإلى الجذور. عندما عكس إتجاه الحركة فى اللحاء عن طريق منع البناء الضوئى فى ورقة معينة فإن التأثير على حركة كل من الفيرس

والفيرويد يمكن ملاحظتها. هذه النتائج كلها تتفق مع الحركة السريعة الجهازية للفيرويد من الورقة المحقونة إلى النسيج ذو الكفاءة العالية فى النمو عبر اللحاء وهذا نفس طريق الفيروسات.

إما عن توزيع السلالتين المعتدلة والشديدة فى أجزاء النبات، فإن جدول رقم ٢٨ يبين مدى تجمع الفيرويدات فى أجزاء النبات المختلفة، ويوضح الجدول أن تجمع السلالة الشديدة يكون فى الأوراق أكبر قليلاً منه فى السلالة المعتدلة وكذلك فى عيون الدرنات أما فى نموات العيون فإن السلالة المعتدلة كانت متجمعة بشكل أكبر.

جدول ٢٨ : اكتشاف السلالة المعتدلة والشديدة فى أجزاء النبات المختلفة فى سبعة أصناف من البطاطس فى طور الإصابة الثانى:

الصنف	السلالة المعتدلة				السلالة المعتدلة			
	أورق	درنات	عيون	نموات عيون	أورق	درنات	عيون	نموات عيون
Azalia	5/8	+	1/5	-	5/8	+	6/6	-
Dryf	5/6	+	4/4	-	6/8	غير موجود	6/6	-
Pola	6/8	+	6/6	-	0/8	غير موجود	0/6	-
San	8/8	+	6/7	12/12	6/8	+	14/14	3/8
Sokola	7/7	+	9/9	27/30	4/7	+	1/8	20/20
Tarpan	6/8	+	6/6	10/10	8/8	+	8/8	25/25
Uran	8/8	+	5/5	15/15	5/8	+	4/4	2/6

يمثل الكسر عدد النباتات الموجود فيها الفيرويد على عدد النباتات المختبرة

+ تعنى الفيرويد موجود. (–) لم تختبر.

تأثير المسبب على التكاثر الجنسى والانتقال خلال البذور الحقيقية فى البطاطس:

لقد تبين أن إصابة نباتات البطاطس بالفيرويد PSTVd يؤثر على التكاثر الجنسى فى النباتات. إن الزيادة المطلقة أو النقصان المطلق فى هذه العملية يعتمد على

الجينوتايب وعلى وضع الإصابة فى الأبوين المستعملين فى الزراعة. وبشكل عام فإن أصناف البطاطس المستعملة والمصابة بالفيرويد عند عمل تلقيح بينهما وهما مصابان هذا يؤدى إلى زيادة معنوية فى عقد الثمار، زيادة وزن البذور وزيادة فى إنبات البذور. عندما يكون الأب (الملقح) مصاب فإن عدد الثمار العاقدة يشابة الكنترول أو أقل وكان هناك زيادة فى عدد البذور فى كل ثمرة. إن هذه الحقيقة التى ذكرت بزيادة عقد الثمار وإنبات البذور التى تحدث، تفسر بأن هناك ميكانيكية للفيرويد PSTVd فى البقاء الدائم فى الطبيعة والذى يتناقض مع إصابات الفيرس للنبات حيث أن هذ العمليات تنخفض بشكل واضح فى نباتات العائل.

يبدو أن فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس يتكيف بشكل كبير جداً للبقاء الدائم والإنتشار خلال البذور الحقيقية فى البطاطس، زيادة على ذلك فإن العلاقة الضعيفة بين ظهور الأعراض على البادرات والمقدرة على الكشف عن الفيرويد جعل اكتشاف البذور الملوثة من الصعوبة بمكان. إن إختبارات البذور الحقيقية فى البطاطس أظهرت أن إنتقال الفيرويد خلال البذور يكون نسبة ١٠٠ ٪ بعد أن تكون هذه البذور قد حفظت على درجة حرارة ٤°م لمدة ١٢ سنة. أما تأثير الفيرويد على عدد البذور فقد وجد أنه إذا كانت الأم سليمة والأب مصاب يكون هناك خفض فى عدد البذور بنسبة ٤٦ ٪ أما إذا كانت الأم مصابة والأب سليم فيحدث زيادة فى عدد البذور بنسبة ٦٦٪. أما إذا كانت الأم مصابة والأب مصاب يحدث خفض فى عدد البذور بنسبة ٦٢٪.

أما بالنسبة لوزن البذور فإذا كانت الأم سليمة والأب مصاب ينخفض وزن البذور بنسبة ٥٠ ٪ أما إذا كانت الأم مصابة والأب سليم يزيد وزن البذور بنسبة ٢٦ ٪. وعندما تكون الأم مصابة والأب مصاب ينخفض وزن البذور بنسبة ٠,٢٥ ٪.

لقد تم اكتشاف فيرويد PSTVd فى حبوب اللقاح فى كثير من أصناف البطاطس المزروعة وذلك باستعمال طريقة R - PAGE. إن تلقيح ازهار النباتات السليمة بحبوب لقاح حاملة للفيرويد أدى إلى إصابة الأوراق الموجودة فى قاعدة

النورة، الأوراق القمية والدرنات. وبإجراء التحليل فى ثمار البطاطس(الثمار الحقيقية) تبين أن هناك إصابات متفرقة فى كل من السبلات، جلد الثمرة ولب الدرنة. أما البذور المأخوذة من كل ثمرة كانت ٣٥ ـ ٦٦ ٪ مصابة بالفيرويد وإن نسبة الإصابة فى البذور لم تختلف باختلاف الصنف ولم تتأثر بموقع النورة أو بعدد الثمار المتكونة فى نفس النورة.

سلالات الفيرويد:

إن لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس سلالتين، إحداهما شديدة Severe والأخرى معتدلة Mild. تختلف السلالة المعتدلة عن السلالة الشديدة فى ثلاثة نيوكليتيدات متغيرة فقط. توجد السلالة المعتدلة فى الطبيعة عشرة أضعاف وجود السلالة الشديدة. إن تحديد وجود السلالة المعتدلة يتطلب حقن أولى فى نباتات الطماطم بالسلالة المجهولة، يتبع ذلك الحقن بالسلالة الشديدة. إن غياب تكشف الأعراض فى النباتات المحقونة يعتبر دليلاً على وجود السلالة المعتدلة. هذا الإجراء بطئ ويحتاج حوالى ٥ ـ ٧ أسابيع ويتطلب تنمية نباتات الطماطم على درجات حرارة عالية وتوفر سلالة شديدة لاستعمالها فى الحقن.

إن طريقة Polyacrylamide gel electrophoresis استعملت على نطاق واسع لتعريف وتحديد وجود جزيئات الفيرويد فى مستخلص الحمض النووى من النبات، إلا أن طريقة R - PAGE وهى Return polyacrylamide gel electrophoresis استحدثت لوصف الفيروسات والفيرويدات ذات RNA الدائرى. إن هذه الطريقة تستطيع أن تكشف عن فيرويد PSTVd فى عينة تحتوى ٨٠٠ بيكوغرام (البيكوغرام يساوى واحد من مليون مليون غرام) من الفيرويد.

لقد أمكن عزل السلالتين عن بعضهما البعض بطريقة R - PAGE، حيث أن الحمض RNA الفيرويدى يهاجر أو ينتقل أكثر بطئاً من الأحماض النووية الأخرى فى المستخلص. إن حركة حزم الفيرويد من العينات المحتوية السلالة الشديدة تكون

٣ - ٤ ملم أبطء فى الاتجاه المنعكس Return direction من تلك المحتوية على سلالات معتدلة. إن التحضيرات الممزوجة من السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة المختلفة تنفصل إلى حزمتين محدودتين جيداً والتى توضح الهجرة المختلفة بين السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة. إن الأصل المأخوذ منه المستخلص من الأعضاء المختلفة (درنات، براعم، مدادات وأوراق) أو أنواع النباتات المختلفة (طماطم، بطاطس) Scopolia sinensis لا يؤثر على سلوك الهجرة فى سلالات الفيرويد. إن هذه الطريقة مؤكدة تماماً مع أكثر من عزلة شديدة وتكون قادرة على عزل وتحديد العزلة المعتدلة من العزلات الشديدة للفيرويد خلال بضع ساعات إذا ما قورنت مع الطرق الأخرى التى تحتاج إلى أسابيع. فى هذه الطريقة تعرض جزيئات الفيرويد إلى ظروف دنتره وهذا يؤدى إلى الحصول على فصل عن طريق بطء الحركة لجزيئات الفيرويد.

اكتشاف السلالة المعتدلة فى بذرة حقيقية واحدة للبطاطس:

إن البذور الحقيقية للبطاطس قد استعملت على نطاق واسع وأصبح عليها طلب كبير فى زراعات البطاطس فى البلاد النامية وذلك بسبب سهولة إنتقالها وتخزينها وخلوها من الكائنات الممرضة التى تصيب البطاطس مع استثناء بعض الفيرسات وفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس. إن البذور الحقيقية للبطاطس قد إستعملت فى الصين منذ سنة ١٩٧٢.

ينتقل فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس بكفاءة عالية عن طريق البذور فى كثير من العوائل النباتية من ضمنها Solanum tuberosum. إذا ما تصادف وجود هذا الفيرويد فى بذرة حقيقية واحدة للبطاطس أو فى إنبوبة اللقاح أو الأجزاء النباتية أثناء عمليات التربية، عندئذ فإن تبادل البذور الحقيقية للبطاطس بين منتجى وزراع البطاطس فى الأقطار المختلفة يتطلب سرعة الكشف عن وجود هذا الفيرويد فى البذرة. إن بادرات البطاطس الناتجة من زراعة بذور حقيقية للبطاطس والمعروف أنها مصابة ١٠٠ ٪ بالفيرويد لا يظهر عليها كلها أعراض الإصابة بالفيرويد. فى بعض

الحالات فإن هذا الفيرويد يمكن أن يكتشف فقط فى النباتات ذات عمر ٢ ـ ٣ أسابيع والنامية من بذور حقيقية مصابة وإذا كانت النباتات ذات عمر أكبر من ذلك فإنه يصعب اكتشاف الفيرويد فيها وبالتالى فإن تشخيص الفيرويد المبنى على الأعراض لوحدها يكون صعب.

إن كشف الفيرويد فى بذرة حقيقية مفردة للبطاطس كان فى السابق يتطلب الحصول على مستخلص الفيرويد من البذرة ثم يحقن هذا المستخلص فى نباتات طماطم **L. esculentum** يتبع ذلك استعمال طريقة PAGE. إن هذه الطريقة تستعمل عدد محدود من العينات وتحتاج إلى وقت طويل. أما طريقة تهجين الحمض النووى تستطيع أن تكشف الفيرويد فى بذرة مفردة من بين ١٦ بذرة أو تستطيع أن تكتشف الفيرويد من عينة تحتوى بذرة مصابة من بين ٨٠ بذرة سليمة.

أما طريقة R - PAGE فقد أجرى عليها بعض التحويرات للتمييز بين السلالة الشديدة والمعتدلة الموجودة فى بذرة حقيقية فى البطاطس. ونظراً لأن كمية البذور المتحصل عليها من الحقول المزروعة بالبطاطس والمصابة بالفيرويد تختلف فى نسبة الإصابة فقد أمكن اكتشاف الفيرويد فى بذرة مفردة ساكنة أو بذرة مفردة قد نمت. وتبين أن البذرة المفردة الساكنة تحتوى ٠,٨ ـ ١٠ نانوغرام من RNA الفيرويدى فى البذرة الواحدة. وقد أمكن بطريقة R - PAGE اكتشاف الفيرويد فى مستخلص بذرة مفردة مخفف ١ : ١٦ يعنى حوالى ٥٠٠ بيكوغرام.

إن البذور المنبتة والبذور الحقيقية للبطاطس النامية فى المعمل على درجة ١٩°م أظهرت معدلات متشابهة فى نقل الفيرويد عن طريق البذور. لم يكن هناك تغير فى اكتشاف الفيريد فى البادرات النامية من بذرة حقيقية مفردة نامية لمدة ٤ ـ ١٠ أسابيع. فى العينات المختلطة من بذور حقيقية سليمة وأخرى مصابة بالفيرويد فقد أمكن اكتشاف الفيرويد فى بذرة واحدة من بين ٩٠ ـ ١٠٠ بذرة سليمة. إن استعمال طريقة R - PAGE هى قريبة الشبه فى النتائج المتحصل عليها من طريقة تهجين الحمض النووى.

المدى العائلى:

إن أمراض النبات المتسببة عن فيرويدات من الممكن أن تقاوم عن طريق ادخال أصناف مقاومة للمرض، هذه الفكرة أدت إلى إجراء أبحاث كثيرة عن مدى قابلية أو مقاومة الأصناف المختلفة من البطاطس للإصابة بالمرض. لقد أجريت إختبارات على ٨١ نوع من البطاطس لمعرفة تفاعلها مع الفيرويد فوجد أن الخمسة أنواع المذكورة فيما يلى هى مقاومة للمرض:-

1 - **Solanum guerreroense**

2 - **S. hjertingii**

3 - **S. multidissectum**

4 - **S. acaule** بعض الطرز فقط

5 - **S. berthaultic**

كذلك فإنه لم يوجد أى صنف منيع Immune ضد الإصابة بفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وباستثناء الأنواع المذكورة فإن جميع الأصناف تظهر أعراض الإصابة بالمرض. هناك ٣٨ نوع من البطاطس تصاب بالفيرويد ولكنها تكون Symptomless. كذلك يوجد بعض الطرز تكون مقاومة للفيرويد عندما يجرى لها حقن بواسطة العصارة ولكنها تصبح قابلة للإصابة إذا حقنت بالتطعيم. لا يوجد أى صنف تابع للنوع **Solanum tuberosum** ذو مقاومة عالية للمرض. يصيب الفيرويد معظم أنواع العائلية الباذنجانيـة، أما العائل المشخص له فهو نـبات الطماطم **Lycopersicon esculantum** Rutgers.

تثبيط الفيرويد:

عند أخذ أجزاء النبات المصابة بفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd وكذلك أنسجة الدرنة المصابة وتعريضها مرات متكررة للتجميد والإذابة تحت

ظروف متحكم بها (-١٨°م إلى - ٢٠°م) ثم ٥°م فإن الفيرويد يفقد من هذه الأنسجة ووجد أنه يختفى بسرعة أكثر فى نسيج الدرنة منه فى العروش. إن درنات ١٧ صنف بطاطس أظهرت نفس النتيجة ولكن بشئ من الاختلاف. فى ٧ أصناف من بين ١٧ صنف فإن الفيرويد إنخفض وجوده بشكل معنوى بعد المعاملة بالتجميد والإذابة مرة واحدة. فى ٦ أصناف من بين ١٧ صنف فإن الفيرويد يمكن أن يسترجع حيويته ويسبب أمراض ثانية بالرغم من تعرضه للتجميد والإذابة. أما عند تعريض درنات البطاطس المصابة بالفيرويد إلى درجة حرارة من ١٣,١°م إلى - ١٥,١°م هذا يؤدى إلى التخلص التام من الفيرويد فى الدرنات.

إن فيرويد PSTVd مقاوم لدرجات الحرارة المرتفعة والمنخفضة وتغيرات pH البيئة. درجة الحرارة المثبطة للفيرويد في العصارة تقع ما بين ٧٥ ـ ٨٠°م أما فى تحضيرات الفيرويد تكون ٩٩ ـ ١٠٠°م. درجة التخفيف القصوى ٥ × ١٠-٤ ملغ / مللتر. إن حيوية العصارة فى نباتات الطماطم المصابة بالفيرويد يمكن أن يحتفظ بها لمدة أربعة أيام على درجة ٢٠°م و ١٠ أيام على درجة حرارة ٤°م. أما عصارة نباتات البطاطس تدوم لمدة ٣، ١٠ أيام بالترتيب بالنسبة للطماطم. أما الفيرويد نفسه RNA فيبقى محتفظ بحيويته لمدة ٤٠ ـ ٤٥ يوم على ٢٠°م ولمدة ٥٠ ـ ٦٠ يوم على ٤°م. عند تخزين الأجزاء النباتية المصابة بالفيرويد وكذلك تحضيرات RNA لمدة طويلة على (ـ٢٠)°م فلا يبقى الفيرويد حياً فى النبات.

وجد أن أفضل تركيز للفيرويد فى نباتات الطماطم يكون عند نموها على درجة حرارة ٣١°م ويكون التركيز أقل عند نموها على درجة حرارة ٢٣°م وعلى شدة إضاءة مختلفة. إن تقصير فترة الإضاءة لمدة ١٧ ـ ١٨ ساعة يومياً لا تؤثر على بناء الفيرويدات فى النبات، أما على ٣١°م فإن الأعراض التى تكون شديدة إذا تعرضت لإضاءة منخفضة تنخفض شدة الأعراض هذه وتتأخر فى الظهور ثانية. أما على درجة ٢٣°م فإن الأعراض تتأخر أسبوعين إذا كانت الإضاءة منخفضة أو مرتفعة. لاتظهر الأعراض إذا وصلت درجة الحرارة ١٥°م فى الليل. إن الأعراض التى تكون

على شكل نكروزز فى الأوراق تظهر بشكل واضح فى درجات الحرارة المتوسطة أكثر منه عندما تكون درجات الحرارة عالية هذا يشابه الإصابة الفيروسية.

يمكن تثبيط الإصابة بالفيرويد PSTVd عن طريق استعمال-DNA Oligonu cleotide. لقد أمكن إجراء تهجين بين مجموعة نيوكليتيدات قصيرة وفيرويد PSTVd فى مخلوط معدى. عندئذ تثبطت إصابة الفيرويد بنسبة ٧٥٪. عندما تكون مجموعة النيوكليتيدات القصيرة مكملة للنيوكليتيدات ٧٩ ـ ١١٠ من الفيرويد. وإن التثبيط الكلى للإصابة الفيرويدية لوحظت عند استعمال مجموعة نيوكليتيدات قصيرة مكملة للنيوكليتيدات ٤٢ ـ ٢٨ فى نفس المولر زيادة من DNA فوق PSTVd، مع أن ٢٠٠ ضعف مولر زيادة كانت كافية للتثبيط الكامل للإصابة بالفيرويد PSTVd.

إن مجموعة النيوكليتيدات القصيرة هذه تخفض الإصابة بالفيرويدات بنسبة ٨٣٪ عندما يتم التهجين على درجة حرارة ٣٠°م. أما مجموعة النيوكليتيدات القصيرة المحتوية ٢٢ و ١٥ قاعدة متوافقة مع مراكز ٤٢ ـ ٦٢ و ٦٣ ـ ٧٨ تظهر تأثير معنوى فى خفض الإصابة على درجات الحرارة المرتفعة جداً.

كما وأن DNA مضاد المعنى المكمل للنطاق الخاص بالمرضية (نيوكليتيدات ٤٢ ـ ٧٨) فى الخيط العلوى من الفيرويد PSTVd يثبط حيوية الفيرويد عندما يحصل لها تهجين فى المعمل لعمل معقد DNA / RNA هذا التثبيط لوحظ فى النباتات السليمة وفى بروتوبلاست النبات.

٢ ـ فيرويدات الحمضيات

Citrus Viroids

أ ـ وصف وتصنيف (تقسيم) فيرويدات الحمضيات

مقدمة :

إن أهمية حدوث الأمراض الفيرويدية فى الحمضيات قد تم تحديدها منذ تعريف فيرويد إكسوكورتز الحمضيات كنوع ممثل لهذه المجموعة التى هى عبارة عن حمض نووى RNA ممرض. وحتى سنة ١٩٨٥ بقى فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd هو الفيرويد الوحيد المعروف جيداً والمعروف أنه يؤثر على الحمضيات. كذلك فإن أبحاثاً كثيرة قد ذكرت بأن هناك مرض يصيب الحمضيات اسمه مرض ككسيا Cachexia وذلك سنة ١٩٨٣ ، إلا أن هذا المرض كان معروفاً منذ سنة ١٩٢٥ واعتبر أنه مرض فيروسى ثم أثبتت الأبحاث بعد ذلك بأنه مرض فيرويدى. وكان يسمى فى السابق مرض زايلوبوروسز Xyloporosis وينتشر فى منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط.

ظهرت بعد ذلك تقارير حديثة تفيد بأن هناك فيرويد مميز عن كلا الفيرويدين السابقين ولكنه يحدث أعراض مرض اكسوكورتز متوسطة إلى شديدة على الاترج أو السترون **Citrus medica** وبالتالى سمى Citron Variable viroid ويرمز له (CVaVd) وذلك منذ سنة ١٩٨٥ . ثم بعد ذلك تم تعريف أعداداً أخرى من الفيرويدات التى تصيب الحمضيات، بعضها وصف على أنه سلالة بسيطة من CEVd والبعض الآخر حدد على أنه فيرويد منفصل.

بعد الدراسات المستمرة على فيرويدات الحمضيات ثبت بأنها مجموعة كبيرة من الفيرويدات أكثر منها فى أى مجموعة نباتية أخرى. ولقد قدر عدد هذه الفيرويدات حوالى ١٢ فيرويد وهى مقسمة إلى خمسة مجموعات وذلك اعتماداً على حجم الجزئ، تماثل تتابع النيوكليتيدات وتفاعل العائل. إن التقدم فى تعريف هذا العدد الكبير من فيرويدات الحمضيات قد تم نتيجة معرفة عائل مشخص جديد وهو الاترج **Citron medica** حيث أن هذا العائل عنده المقدرة بأن يكون عائل عام لجميع فيرويدات الحمضيات. إن البادرات الحساسة لطراز من السترون (الاترج) وهو نوع Arizona 861 - S1 قد عمل كحاوية أولية لفهرسة مرض الاكسوكورتز وذلك لمدة عشرة سنوات منذ سنة ١٩٧٧. هذا الطراز من الاترج يكون أيضاً عائل بدون أعراض Symptomless لفيرويد ككسيا فى الحمضيات.

إن الأبحاث القديمة التى كانت تجرى على مرض اكسوكورتز الحمضيات كانت تذكر أعراض المرض بأنها تشوهات فى قلف الشجرة وإنفصاله عن الساق وتشققه، هذه الأعراض تظهر على الأصل، ويظهر تقزم ملحوظ فى الأشجار النامية على برتقال ثلاثى الأوراق **Poncirus trifoliata** وأصول ليمون **(Citrus limo-nia)** Rangpru. وهكذا فإن الاختلافات فى درجة التقزم وتكون القشور ووقت ظهور هذه الأعراض التى كانت تذكرها الأبحاث القديمة أدت إلى القول بأن هناك سلالات مختلفة من مسبب مرض اكسوكورتز الحمضيات.

إن تطور ظهور الإختبارات الحيوية باستعمال الاترج **Citrus medica** وحساسيته العالية وسرعة تكشف الأعراض عليه أدى إلى التنازل الفعلى عن البرتقال ثلاثى الأوراق ذو النظام الكلاسيكى فى فهرسة المرض كما وأن ظهور تنوعات من الأعراض على الاترج تتراوح من تقزم شديد تدلى الأوراق وتجعدها ونكروزز والتفاف عنق الورقة بالإضافة إلى نكروزز العرق الوسطى والتلون البنى لقمه نصل الورقة، كلها إعتبرت أدلة مشخصة للإصابة بمرض اكسوكورتز الحمضيات.

الأعراض الحقلية كانت دائماً تصنف على أساس أعراض بسيطة، متوسطة أو شديدة فقط وذلك على أساس تفاعل الاترج. فى معظم الحالات فإن هذا التصنيف لم يتأكد عن طريق حقن البرتقال ثلاثى الأوراق لتثبيت الأعراض الكلاسيكية لمرض اكسوكورتز الحمضيات.

بعد نقل العزلات الشديدة لمسبب المرض إلى عوائل عشبية مثل **Gynura aurantiaca** فإن العامل المسبب أمكن عزله ووصفه بأنه يتكون من حمض نووى RNA به ٣٧١ نيوكليتيدة وسمى فيرويد اكسوكروتز الحمضيات-The citrus exocortis viroid (CEVd). عند حقن الاترج بتحضيرات نقية من فيرويد CEVd المأخوذ من نبات **Gynura** دائماً يظهر عليه أعراض التقزم الشديدة، تدلى الأوراق وتجعدها، هذه الأعراض توصف بها العزلات الشديدة. أما مصادر العدوى التى تسبب تفاعل بسيط أو معتدل مع الاترج لا يمكن أن تنقل إلى نبات **Gynura**.

واعتماداً على نتيجة الأبحاث التى أجراها Schlemmer **et al** سنة ١٩٨٥ والعالم Duran - Vila **et al** سنة ١٩٨٦ فإنهم قد ضموا على الأقل ثلاثة فيرويدات مميزة تسبب أعراض بسيطة ومتوسطة على الاترج، إلا أنهم قد ذكروا بأن تحليل الأعراض الحقلية كلها بواسطة تتابع طريقة PAGE قد أظهرت بأنها تحتوى من واحد إلى خمسة فيرويدات.

أما باستعمال طرق الكشف الأكثر تقدماً فى أبحاث الفيرويدات وباستعمال طرق تحليل الكروماتوغرافى السليليوزية CF - 11 والتهجين الجزيئى لمنقب خاص بفيرويد الحمضيات أمكن وصف عدداً من فيرويدات الحمضيات من مصادر حقلية ومن مجموعات فيرويدية أخرى فى أسبانيا وكاليفورنيا وكانت هذه الفيرويدات الموصوفة تحدد اعتماداً على الصفات الفيزيائية والحيوية وقد ذكرت بأنها خمسة مجموعات محددة.

تطابق فيرويدات الحمضيات فى عزلات الاكسوكورتز:

Identification of Citrus Viroids In Exocortis Isolates

إن نتائج الأبحاث التى قام بها Duran - Vila et al سنة ١٩٨٦ تدل على أن العوامل القابلة للانتقال المرافقة مع مرض اكسوكورتز الحمضيات يمكن أن تضم عائلة من الفيرويدات عدا عن CEVd وأن حجوم هذه الفيرويدات تتراوح من ٢٧٥ ـ ٣٧١ نيوكليتيدة. عندما حضر خليط صناعى من تحضيرات حمض نووى من أترج (سترون) بعزلات منتقاه ثم عرضت للتحليل بطريقة تتابع PAGE، ظهر أن هناك ثمانية فيرويدات على الأقل عدا عن فيرويد CEVd وفيرويد الأترج المتقلب Citron Variable Viroid (CVaVd). ولكى تختبر صفات هذه الفيرويدات، تؤخذ مزارع نقية من هذه العزلات حيث توجد طبيعياً ويمكن أن تتناسخ فى عوائل عشبية خاصة أو عن طريق electron - elution لشريحة فيرويد مفردة بعد عملية d PAGE. هذه الأحماض النووية للفيرويدات وصفت وحددت باستعمال الطرق الآتية:ـ

١ ـ يمكن اكتشاف الأشكال الدائرية والمستقيمة بواسطة طريقة d PAGE.

٢ ـ مقارنة معدلات الهجرة للأشكال الدائرية.

٣ ـ تحديد إنجذابها فى طريقة CF - 11 سليليوز.

٤ ـ تقدير تماثل تتابع نيوكليتيداتها باستعمال التهجين الجزيئى عن طريق المنقب cDNA للفيرويدات الخاصة.

بعد إجراء هذه الطرق على الفيرويدات تبين أنها تتكون من خمسة مجموعات. المجموعة الأولى هى مجموعة CEVd أما المجموعة الثانية فهى مجموعة فيرويدات الحمضيات رقم I وتسمى CVd - 1 وهذه المجموعة تشمل فيرويدين الأول 1a والثانى 1b. أما المجموعة الثالثة فهى مجموعة فيرويدات الحمضيات رقم II

وتسمى CVd - II وهى تشمل أيضاً II a ، II b وإن هذا الأخير كان يسمى فيرويد ككسيا للحمضيات Citrus Cachexia Viroid ويرمز له (CCaVd). أما المجموعة الرابعة فهى تشمل أربعة فيرويدات CVd - IIIa ، IIIb ، IIIc ، IIId . أما المجموعة الخامسة فهى تسمى مجموعة الحمضيات رقم IV وتضم فيرويد واحد فقط. وبالتالى يكون هناك عشرة فيرويدات تصيب الحمضيات كما هو ظاهر فى جدول رقم ٢٩ .

جدول ٢٩ : مقارنة بين الصفات الفيزيائية لفيرويدات الحمضيات.

المجموعة	الفيرويد	عدد النيوكليتيدات	النسبة المئوية للايثانول التى فيها تبدأ الفيرويدات فى الغسيل		تفاعل التهجين مع مثقب cDNA			
			٢٥٪	٢٠٪	CEVd	CVd - Ib	CCaVd	ASBVd
CEVd	CEVd	٣٧١	—	+	++++	-/+	—	—
CVd - I	CVd - Ia	٣٤٠	—	+	—	++++	—	—
	CVd - Ib	٣١٨ ،٣٣٠	—	+	—	++++	—	—
CVd - II	CVd - IIa	٣٠٢ ،٣٠٥	+	—	—	—	++++	—
	CVd - IIb	٢٩٩ ،٣٠٠	+	—	—	—	++++	—
CVd - III	CVd - IIIa	-	+	—	—	—	—	—
	CVd - IIIb	٢٩٠	—	+	—	—	—	—
	CVd - IIIc	٢٨٥	—	+	—	—	—	—
	CVd - IIId	٢٨٠	—	+	—	—	—	—
CVd - IV	CVd - IV	٢٧٥	+	—	+	—	—	—

ملاحظات على الجدول:ـ

١ الفيرويد الذى أمامه رقمين عن عدد النيوكليتيدات يدل الرقم الأول على الأبحاث القديمة والرقم الثانى مأخوذ من الأبحاث الحديثة.

٢ ـ يتم تحديد القواعد اعتماداً على حركة الفيرويدات فى ال PAGE .

٣ ـ التفاعل النسبى مع cDNA حدد بواسطة Electrolbot hybridization. تبدأ بمعدل (+) إلى أعلى مستوى (++++) مبنى على التقدير المنظور لكثافة الشرائح Autoradiograph عند مقارنتها مع تركيز الفيرويد، كما يلاحظ بعد الصبغ بمادة برومايد الإيثيديوم قبل ال electrotransfer.

تعريف مجموعات فيرويدات الحمضيات:

Definition of Citrus Viroid Groups

١ - مجموعة CEVd :

هذه المجموعة تمثل مجموع الفيرويدات (العزلات، التنوعات، الأشكال) التى تتبع فيرويد اكسوكورتز الحمضيات. إن فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd هو العامل المسبب لمرض اكسوكورتز الحمضيات وهو أكبر فيرويدات الحمضيات إنتشاراً وأكثرها دراسة وتحديداً وله تنوعات تتابع ذات نيوكليتيدات تتراوح من ٣٧١ إلى ٣٧٥. وهو أكثر فيرويدات الحمضيات سهولة ودراسة وله مدى عوائلى واسع أكبر من بقية فيرويدات الحمضيات كما هو فى جدول ٣٠ وهو يسبب تقزم شديد، تدلى الأوراق ونكروزز على أشجار الاترج المحقونة به وسوف نتكلم عن المرض بالتفصيل فيما بعد إن شاء الله.

حالة شاذة لفيرويد CEVd :

هناك تنوع غير عادى لفيرويد اكسوكورتز الحمضيات اكتشف سنة ١٩٩٣ من قبل العالم J.S. Semancik ورفقاءه وذلك أثناء عملهم على **G. aurantiaca**. وجد هذا الفيرويد عندما استعمل مصدر لقاح من **G. aurantiaca** وإستعمل لحقن هجين طماطم ناتج من تلقيح الطماطم-**Lycopersicon esculentum** X **L.** peruvia-num. وجد أن هذا التنوع يحتوى ٩٢ نيوكليتيدة إضافية على النيوكليتيدات الأصلية فى CEVd. وحيث أن الوضع الطبيعى لفيرويد CEVd يحوى ٣٧١ نيوكليتيدة فيصبح التنوع الجديد به ٤٦٣ نيوكليتيدة وسمى هذا النوع- CEVd D92 والذى يظهر صفات الشكل المستقيم والدائرى للفيرويد ويحوى تتابع مكرر مرتين للمسافة بين نطاق V و T_2 وهذا التكرار يساوى ٩٢ نيوكليتيدة. هذا الفيرويد يعطى أعراض بسيطة جداً أقل من الأعراض المعتدلة تظهر على **Gynura**. عند مقارنة هذا الفيرويد (مقارنة تتابع وتركيب CEVd - D92) مع فيرويد

كادانج ـ كادانج ظهرت تشابهات فى المناطق المولدة للتكرار الطرفى الذى يحدث طبيعياً، مما يؤدى إلى الاقتراح إلى إمكانية تحديد الموقع المفضل لإعادة الاتحاد فى RNA بين الفيرويدات.

إن الطريقة الصحيحة لتولد CEVd - D92 غير معروفة، وعلى أية حال فإن اللقاح الأصلى هو CEVd تنوع t ويكتب (CEVd t) إختبر بواسطة هجين طماطم. إنه من غير الممكن تقليد أو الحث على إنتاج هذه المجموعة ٩٢ الزيادة فى تنوع CEVd . هناك عاملان يبدو أنهما أساسيان فى تخليق وإحداث CEVd - D92 هما: ١ ـ هجين الطماطم الناتج من تلقيـح **L. esculentum** مع **L. peruvianum** . ٢ ـ وجود عزلة CEVd مختارة بواسطة ذلك العائل من بين تجمعات CEVd المنتجة فى نبات **Gynura** . إن الطماطم الهجين ليست هى النقطة الأساسية فقط فى إشتقاق CEVd - D92 ولكنها تلائم تكاثر وتجمع تنوع ال ٤٦٣ نيوكليتيدة أكثر منه فى أل CEVd.

إن السلالة CEVd - D92 لم تعرف أبداً منذ ما يزيد عن ٢٠ سنة من الأبحاث المستمرة على فيرويد CEVd فى الجينيورا، زيادة على ذلك لم يكن هناك دليل على تناسخ هذه السلالة عندما كان يخلط CEVd وCEVd - D92 كمصدر لقاح فى الجينيورا. مع ذلك فإنه من الممكن القول بالنقل المنفصل لهذه السلالة فى الجينيورا عندما يستعمل اللقاح الأولى كمصدر نقى من هذه السلالة. هذا يمكن أن يدل على أن تخليق الزيادة الطرفية فى CEVd لا يكون محدوداً أو أنه حادث غير عادى ولكن إلى حد ما فإن هذا التناسخ والتجمع لهذا التنوع يكون معرضاً إلى منافسة غير ملائمة مع CEVd فى بعض العوائل.

فى عملية إصابة الجينيورا بالسلالة CEVd - D92 يظهر تغيرات مرضية بسيطة جداً وتكون على شكل نكروزز يتقاطع مع العرق الوسطى فى الورقة، وهذا يمثل أبسط أنواع التفاعل المذكورة لأى عزلة من الفيرويد CEVd فى الجينيورا. إن وجود نفس تتابع النيوكليتيدات كما فى CEVd والذى يحدث تفاعل شديد من

الأعراض مع زيادة فى العدد الكلى للنيوكليتيدات يؤكد مرة ثانية أهمية التكوين فى تعبيرات النشاط الحيوى فى الفيرويدات. ولكن يبقى السؤال المحير وهو لماذا تحدث أعراض بسيطة من هذه العزلة؟؟.

إن تتابع النيوكليتيدات فى السلالة CEVd - C تختلف عن السلالة CEVd - A فى أربعة قواعد فقط هى رقم ٢٦٤، ٢٧٨، ٣٠١، ٣١٣. لقد استعملت السلالة C كمرجع لدراسة تتابع العزلة الجديدة CEVd - D92 وذلك نظراً لأن كلا العزلتين مأخوذة من نفس أصل المصدر وتكاثرت فى الجينيورا **Gynura**. كما وأن تتابع السلالة الجديدة تشارك سلالة A على مواقع تركيبية متساوية فى ثلاثة نيوكليتيدات هى أرقام ٢٦٤، ٢٧٨ و ٣٠١ وهى من الأربعة مواقع المميزة للسلالة A عن السلالة C. وبالتالى فإن الاختلافات بين عزلات الفيرويد CEVd تكون أقل حد ممكن.

يجب أن نعطى أهمية لحقيقة أن كلا التتابعين فى سلالة A وسلالة C قد حدد من قبل عشرة سنوات (١٩٨٣) وذلك عن طريق التتابع المباشر للحمض RNA وأن هذه الطريقة وهذا الوقت قد يكون له بعض الأخطاء. وعلى أية حال فإن تتابعات ثلاثة أرباع الطول الكامل لكلونات العزلة الجديدة كانت مثالية وبالتالى تدل على درجة عالية من التماثل فى تجمعات العزلة الجديدة مقوية العلاقة القريبة مع التتابعات المذكورة للسلالة A مع تلك التى فى السلالة C.

بمعاينة المناطق ذات التتابع المتكرر فى العزلة CEVd - D92 يلاحظ أن أربعة نيوكليتيدات متسلسلة هى AGCU تسبق مباشرة بداية ونهاية التكرار العلوى على نهايات ١٣٢ إلى ١٣٥ و ١٧٩ إلى ١٨٢ بالترتيب، هذه المواقع تدعم النموذج المتوقع حين حدوث تأثيرات فجائية لـ RNA Polymerase فى عمل نسخ متقطع، كما قد إقترح عند حدوث التكرار الطرفى الموجود فى فيرويد CCCVd. إن أهمية هذه النيوكليتيدات الأربعة فى العروة النهائية من نطاق T_2 قد ظهرت عند فقد الحيوية للفيرويد بعد إزالتها من التتابع، وبالتالى فإن التعبيرات البيولوجية

لفيرويد CEVd يمكن أن تستبدل بشدة بواسطة إما غياب أو تكرار هذه الأربعة قواعد وهذا يبنى إقتراحاً عن أهمية القواعد فى تجهيز الحمض RNA.

إن التتابع المتكرر فى CEVd - D92 يبدأ تقريباً على حد اليد اليمنى بالضبط من منطقة Pr ضمن نطاق V وهو موقع هام يتدخل فى إعادة تنظيم RNA بين الفيرويدات، وبالتالى فإن المرضية يمكن أن تتغير بشكل مثير فى غياب التتابعات الأساسية فى نطاق P أو التغيير العال فى منطقة Pr من نطاق V.

إن تحريك أو تعبئة نطاق T تفهم ضمناً من دراسة تماثل تتابع الفيرويد وصفات الفيرويد المتوقع. إن إتجاه تكرار T_2 فى فيرويد CCCVd وكذلك كما حدث فى CEVd من تضاعف يمكن أن يهدف إلى مواقع التجهيز المشجع فى تغييرات RNA فى نطاقات T بين الفيرويدات وبالتالى يمكن أن تكون مهمة فى إعادة الاتحاد والتطور فى جزئ الفيرويد.

قياساً على ظهور السلالة الجديدة D92 لفيرويد اكسوكورتز الحمضيات فإن التتابع المتكرر المتشابه فى نطاقات V وT_2 فى الفيرويد CCCVd يجب أن لا ينظر إليه الآن وكأنه ظاهرة غريبة. إن التطابق الموجود بين التركيبين يؤدى إلى القول بأن حوادث مماثلة فى تجهيز الفيرويد يمكن أن تحدث فى المستقبل فى التنوعات الكبيرة. كذلك فإنه عند مقارنة CCCVd والسلالة الجديدة CEVd - D92 يظهر أن هناك مواقع خاصة ظاهرة ذات أهميــة والتى يمكن أن تكون هامة جداً فى تجهيز RNA أو تعكس بسهولة أية مناطـق يمكــن أن يظهر فيها ارتباك فى التركيب.

٢ ـ مجموعة CVd - 1 :

وجد أنــه بعد تحليل عـزلات الاكسوكورتز فى كل من إسبانيا وكاليفورنيا تبين وجود فيرويد CVd - 1a بنفــس electrophoretic mobility (كما فى

الفيرويد RNA - 1 الذى ذكر فى أبحاث سابقة وأنه مسبب مرض للحمضيات) فى سبعة عزلات من بين ٣٧ عزلة مختبرة. عندما عرضت العزلات المختارة إلى Co - electrophoresis كمخلوط صناعى تحت ظروف دنترة، لم يلاحظ إختلافات فى معدل الهجرة فى عزلة CVd - 1a المأخوذة من مصادر مختلفة. وعلى النقيض من التفاعل الشديد المحدث بواسطة CEVd فى الأترج (السترون) وحيث أن أشجار السترون المحقونة بالفيرويد CVd - 1a نقى قد أظهرت التواء ملحوظ فى نصل الورقة وذلك كاستجابة للمواقع التى فيها نكروزز فى العرق الوسطى للورقة على السطح السفلى، على ١ ـ ٣ ورقات فقط من النباتات المحقونة.

إن التركيب الأساسى لمكونات عزلة فيرويد CVaVd (فيرويد السترون المتقلب وهو (Citron Variable Viroid) عند إجراء تحليل لها وجد أنها تهاجر بسرعة أكثر قليلاً من CVd - 1a وبالتالى عرفت على أنها CVd - 1b. هذه العلاقة المفهومة ضمناً مبنية على الحجم الذى حصل عليه بالاعتماد على معدلات متشابهة من الازالة لـ CVd - 1a و CVd - 1b من سيليلوز CG 11 وإن كلا الفيرويدين له مدى عائلى مقتصر على الاترج (السترون) كما فى جدول ٣٠.

إن تماثل تتابع النيوكليتيدات بين CVd - 1a و CVd - 1b يقدر بواسطة التهجين الجزيئى بمنقب CVd - 1b cDNA. عند مقارنة عينات من الحمض النووى مأخوذ من الأترج المحقون بعزلتين من CVd - 1a وعينة نقية من CVd - 1b (استعملت العزلة CVaVd لتنقية CVd - 1b) أجرى لهما electrotransferred مباشرة من الجيل محتوياً ٨ مول يوريا وهجنت مع Randomly Primed P^{32} la-belled CVd - 1b cDNA فتبين أن العزلتين هما فيرويدين منفصلين CVd - 1a و CVd - 1b.

جدول ٣٠: إنتقال وكثافة الأعراض لفيرويدات الحمضيات فى كواشف خاصة بالفيرويد.

المجموعة	الفيرويد	الأعراض فى النباتات الكاشفة			
		الاترج	الخيار	الاقحوان	جانيورا
CEVd	CEVd	++++	+	++++	++++
CVd - I	CVd - 1a	++	_	_	_
	CVd - 1b	++	_	_	_
CVd - II	CVd - IIa	+	+++	++	_
	CVd - 1Ib	+	+++	++	_
CVd - III	CVd - 1IIa	+++	_	_	_
	CVd - 1IIb	+++	_	_	_
	CVd - 1IIc	+++	_	_	_
	CVd - 1IId	+++	_	_	_
CVd - IV	CVd - 1V	+++	+	_	_

ملاحظات:

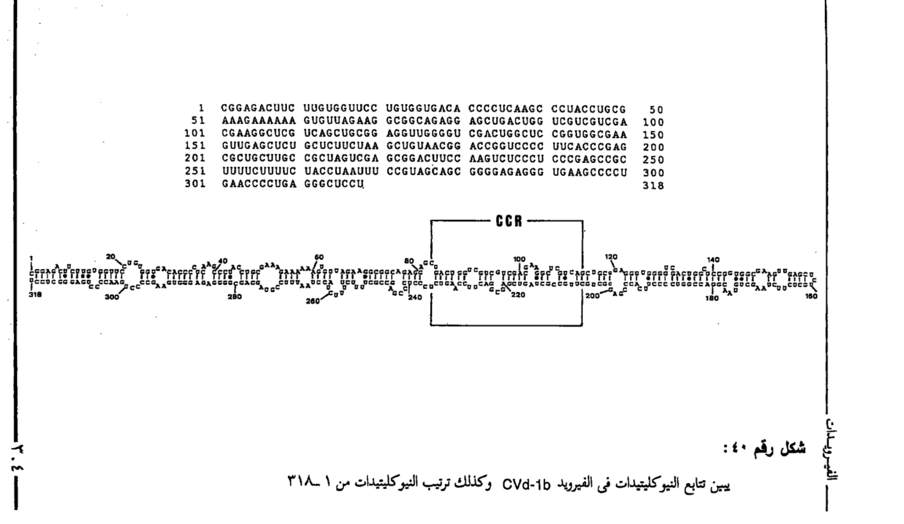
++++ = شديد، +++ = متوسط، ++ = بسيط، + = حامل بدون أعراض (يتكاثر الفيرويد) – = بدون أعراض ولكن لا يتكاثر الفيرويد فى النبات.

فى دراسة اجراها Lilach Ashulin وزملائه فى مركز أبحاث بيت دجن فى اسرائيل سنة ١٩٩١ ذكر فيها أن الفيرويد CVd - 1b هو فيرويد منفصل عن مجموعة فيرويدات الحمضيات. ولقد وجدوا أن هذا الفيرويد يسبب تقزم أشجار الكريب فروت Grapefruit فى اسرائيل ويسبب إنحناء أوراق الحمضيات وسمى Citrus bent leaf Viroid ويرمز له (CBLVd) ولقد عزل ونقى من اوراق

الافوكادو وبعد إتباع جميع طرق العزل والتتابع لهذا الفيرويد وجد أنه يتكون من ٣١٨ نيوكليتيدة (كان قد ذكر سابقاً أنه يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيدة) وقد ذكروا أن هذه النيوكليتيدات فى خط مستقيم كما فى شكل ٤٠ ووجد أن به ٦٦٪ أزواج قواعد وقد صنفوا هذا الفيرويد مع تحت مجموعة ASSVd وذلك إعتماداً على مميزات المنطقة المركزية المحفوظة. فى حين أن جزء من منطقة النطاق P ومنطقة النهاية اليسرى تشبه فيرويد CEVd، وبالتالى ذكروا أن هذا الفيرويد هو أول فيرويد من تحت مجموعة ASSVd يصيب نباتات الحمضيات.

نقل فيرويد CVd - 1b إلى الأفوكادو:

لقد تم نقل الفيرويد CVd - 1b إلى الافوكادو بواسطة التطعيم غير المتوافق، حيث نقل هذا الفيرويد من **Citrus macrophlla** بالتطعيم إلى بادرات الافوكادو **Persea americana**. ولقد وجد أن النقل المستمر لهذا الفيرويد بالتطعيم غير المتوافق له مدى عائلى محدود فى بضعة طرز من الافوكادو. إن المستخلص المأخوذ من افوكادو مصاب بالفيرويد CVd - 1b كان فعال على السترون (الاترج) وأحداث إلتواء فى الأوراق وتشوه الثمرة. كان أول تقرير عن إنتقال هذا الفيرويد إلى عائل غير الحمضيات بواسطة Rivka et al سنة ١٩٩٢ فى اسرائيل. إن مستخلصات الحمض النووى والنسيج المطعوم من أفوكادو نوع WI المصاب بالفيرويد CVd - 1b كانت فعالة على الاترج. إن هذا الفيرويد أمكن اكتشافه فقط بواسطة طريقة تحليل sPAGE فى نباتات الاترج والتى حقنت ميكانيكياً أو طعمت بنسيج مأخوذ من أفوكادو مصاب بالفيرويد CVd - 1b. هذا يؤدى إلى القول بأن نباتات الأفوكادو لم تصبح شاذة أو أقل من أن تصاب بالفيرويدات الأخرى (عدا عن الفيرويد الخاص بها) الموجودة فى **C. macrophylla**. إن نباتات الأفوكادو المحقونة بعزلة تسمى GTD 225 - S (عزلة تحمل عوامل التقزم القابلة للانتقال بالتطعيم) وهى تابعة للفيرويد CVd - 1b فوجد أن تركيز الفيرويد فى أوراق الأفوكادو خمسة إلى عشرة أضعافه فى الأترج، هذا يجعل الأفوكادو مصدر جيد لدراسة الصفات الأخرى لهذا الفيرويد. ولقد وجد أن تشوه ثمار الأترج يمكن أيضاً أن يفسر كنتيجة للإصابة بهذا الفيرويد CVd - 1b.



شكل رقم ٤٠ :

يبين تتابع النيوكليتيدات فى الفيرويد CVd-1b وكذلك ترتيب النيوكليتيدات من ١ ــ٣١٨

إن التطعيم غير المتوافق بين عوائل غير متوافقة قد ذكر سابقاً بأنه يستعمل لنقل الفيرويدات لنباتات كاشفة. واعتماداً على ذلك يمكن أن تمتد عوائل الفيرويد إلى محاصل نباتية مهمة إقتصادياً، ويمكن أن تزداد أهميته الاقتصادية ونحصل على فوائد علمية من حيث استعمال إختبارات النقل بالتطعيم غير المتوافق للبحث عن المدى العائلى للفيرويدات المعروفة على الأشجار المثمرة والمهمة إقتصادياً.

٣ ـ مجموعة CVd - II :

كما ذكرنا سابقاً فإن العالم Duran - Vila et al سنة ١٩٨٦ قد ذكروا بأن هناك مجموعة فيرويدية سموها RNA - II تكون مرافقة مع مصادر مختلفة من الفيرويدات. لقد وجد أن هذه المجموعة يمكن اكتشافها بتركيزات منخفضة جداً فى جميع مصادر الفيرويدات التى درست بالإضافة إلى حاملى الفيرويد بدون أعراض والتى من المحتمل أن تكون أشجار أترج سليمة.

عند تحليل أوراق نبات الأترج الذى يظهر عليه أعراض بسيطة تتمثل فى ظهور لون بنى خفيف فى قمة نصل الورقة وتتكشف فقط فى النباتات النامية تحت ظروف تغذية وحرارة مثلى، توحى بوجود فيرويد حمضيات CVd - IIa وهذا اكتشف بنفس الحركة فى أل electrophoretic كما فى RNA - II المذكور سابقاً. إن عمليات الاستبعاد باستعمال ٢ مول كلوريد الليثيوم واستبعاد الأحماض النووية باستعمال CF - 11 سيليلوز أظهرت أن CVd - IIa قد غسل على ٢٥ ٪ إيثانول STE. وبالتالى فإن الغسيل المستمر بمادة ethanol - STE 30% والاستبعاد بـ ٢٥ ٪ ايثانول STE سمح باكتشاف تحضيرات غنية بالفيرويد. بتحليل العينات التى أجرى لها electro - eluted بواسطة طريقة Sequential gel electrophoresis أظهرت وجود فيرويدات تتصف بالشكل الدائرى والمستقيم.

عندما حقن أترج إريزونا نوع S1 - 861 بفيرويد نقى من CVd - IIa حتى فى أنواع الأترج التى تكون غالباً غير مظهرة للأعراض، فقد أمكن إسترجاع الفيرويد

ثانية من النباتات المحقونة بعد ٣ شهور. كذلك أمكن ملاحظة تلون بنى بسيط جداً على قمة نصل الورقة عندما حضنت النباتات تحت ظروف مثلى من الحرارة وطول النهار. هذا العرض كان قد صنف على أنه أبسط أشكال مرض الاكسوكورتز عندما يتفاعل فى الأترج. عندما حقن CVd - IIa فى نباتات الخيار فإنه أظهر تقزم شديد وتدلى الورقة والتفافها ولون أخضر داكن مغطى الورقة غير ظاهر فى النباتات غير المحقونة. أمكن استرجاع الفيرويد ثانية من نباتات الخيار المصابة بعد ثلاثة أسابيع من الحقن.

فى التقرير الأصلى الذى ذكره Duran - Vila et al سنة ١٩٨٦ أنه حسب طبيعة الفيرويد المذكور فى RNA II لا يمكن أن يظهر بوضوح وأن إمكانية إحتواء العائل للفيرويد قدرت مبدئياً. وعلى أية حال عندما أخذت تحضيرات حمض نووى من بادرات أترج إريزونا 861، كانت متشابهة تحليلياً ولم يلاحظ أية شرائح لـ RNA فيرويدى. كذلك لم يمكن اكتشاف أحماض نووية RNAs فيرويدية بواسطة التحليل بطريقة PAGE فى تحضيرات من كلونات مختلفة تكاثرية لأترج أريزونا SI - 861.

إن المعلومات المتوفرة عن صفات الربط المختلفة للفيرويدات إلى السيليلوز والنتائج الملاحظة فى تجارب Duran - Vila et al سنة ١٩٨٨ توضح التقارير التى تذكر غياب RNA II فى تحضيرات الفيرويد نظراً لأن السيليلوز قد غسل بشدة بمادة ethanol - STE 25% وبالتالى ازالة CVd - IIa من تحضيرات الفيرويد، وبذلك فإن إفتراض أن RNA II هو فيرويـد للعائل يجب أن يلغى وأن الاسـم CVd - IIa يجب أن يستعمل لما كان يسمى سابقاً RNA II.

إن إعادة التحليل لعزلة CVaVd الذى قد وصـف أصـلاً بواسطة Schlemmer et al سنة ١٩٨٥ قد أظهر وجود فيرويد آخر هو (CVd - IIb) وهو ذو حركة electrophoretic مشابهة جداً إلى (لكن يختلف عن) CVd - IIa. باستمرار الأبحاث وجد أن CVd - IIb الذى هو فيرويد ككسيا (CCaVd) هو العامل المسبب

لمرض ككسيا Cachexia فى الحمضيات هذا ما أكد عليه Semanik et al سنة ١٩٨٨ وكذلك Duran - Vila سنة ١٩٨٨ ، وبالتالى أمكن القول بأن هناك فيرويدين الأول IIa وآخر مشابه جداً له هو IIb.

عند حقن نباتات الأترج بعينات من فيرويد CVd - IIb = CCaVd ويحضن تحت مدى متطرف من الظروف لا تظهر أى أعراض ولكن الفيرويد يمكن استرجاعه دائماً من النباتات المحقونة وغير مظهرة للأعراض خلال ٣ شهور بعد الحقن. كان أول استبعاد للفيرويد CCaVd الذى هو CVd - IIb من ايثانول- CF 11 cellu lose 25% جدول ٢٩ وأظهر أعراض نموذجية لتلك المتسببة عنCVd IIa - على نباتات الخيار المحقونة. نتائج التهجين الجزيئى باستعمال منقب cDNA إلى CVd - IIb أكد بأن CVd - IIa و CVd - IIb فيرويدان منفصلان وبينهما تشارك بدرجة عالية من تماثل التتابع.

علاقة فيرويدات CVd - II مع فيرويد HSVd :

من الدراسات الحديثة التى أجريت على فيرويدات المجموعة الثانية من فيرويدات الحمضيات وعلاقتها مع فيرويد تقزم حشيشة الدينار(HSVd) Hop Stunt Viroid تبين أن هناك تسعة تنوعات تتابع لفيرويد HSVd، من هذه التسعة هناك ثلاثة تنوعات تصيب الحمضيات. إن تنوعات HSVd التى تصيب الحمضيات لها صفات فيزيائية وحيوية تشابه مجموعة II من فيرويدات الحمضيات CVd - II. وهذه المجموعة كما سبق وذكرنا تتكون من IIa العامل المسبب لمرض الاكسوكورتز البسيط فى الحمضيات و IIb العامل المسبب لمرض ككسيا Cachexia فى الحمضيات. تحت ظروف الحقل فإن فيرويدات IIa تحدث تشقق بسيط فى القلف فى البرتقال ثلاثى الأوراق ولا تظهر أى تفاعل مع الماندلين ولا مع التانجالو. إن IIa تحدث تلون بنى فى قمة الورقة، تجعد عنق الورقة ونكروزز فى العرق الوسطى فى نباتات الأترج تحت ظروف الصوبا المتحكم بها.

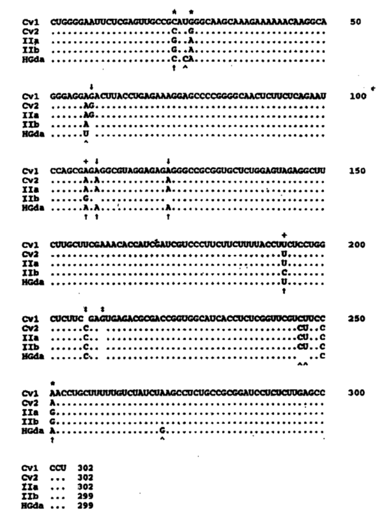
أما IIb فهو يسبب مرض ككسيا فى الحمضيات. تحت ظروف الحقل فإن هذا الفيرويد لا يسبب ظهور أعراض على البرتقال الثلاثى الأوراق ولكنه يسبب تصمغ، تنقر فى الخشب وتكتلات فى الماندرين والتانجالو أما فى الأترج وتحت ظروف الصوبا الزجاجية فإن IIb تتميز بإصابات مستترة (كامنة).

إن IIa و IIb تختلف فى الحجم عن بعضهما البعض ببضعة نيوكليتيدات، علاوة على ذلك فإنهما يسببان مرضين مميزين مختلفين على الحمضيات. التتابع فى كل من IIa و CVd - IIb يمكن أن يثبت علاقة كل منها بالآخر وعلاقتهما مع تنوعات HSVd الخاصة بالحمضيات والمذكورة فى اليابان، وتنوعات HSVd المترافقة مع العامل المسبب لتقزم الكريب فروت (HGda).

بإجراء عمليات التحليل المختلفة والحديثة تبين أن IIa قد تحدد بـ ٣٠٢ نيوكليتيدة مشابهة لاثنتين من تنوعات HSVd الخاصة بالحمضيات من اليابان وتشارك أكثر من ٩٩٪ من تماثل التتابع مع الفيرويدات اليابانية. هذه المجموعة من تنوعات HSVd ذكر أيضاً بأنها تسبب مرض اكسوكورتز بسيط على بعض أنواع الحمضيات. كما وأن IIa تختلف عن IIb عن طرق إلغاء ثلاثة نيوكليتيدات وتغيير مواقع إثنتين من النيوكليتيدات. هذه التغيرات يمكن أن تستعمل كعلامة لسرعة تشخيص IIb ولتمييزها عن IIa على مستوى النيوكليتيدات عن طريق تكبير جزء صغير فقط من جينوم الفيرويد. على موقع معين ضمن IIb تكون المنطقة المحتوية خمسة G ممتدة من نيوكليتيدة رقم ١٠٦ إلى رقم ١١٠ مزودة هذا التغيير بتناسق فى العزلات الأخرى للفيرويد IIb. أربعة من النيوكليتيدات المتغيرة تحدث فى الفيرويد فى النطاق المتغير وواحدة فى موقع ٥٨ فى نطاق المرضية فى الفيرويد. هذه التغيرات يمكن أن تغير التركيب الثانوى فى الفيرويد IIb وتؤثر على المرضية للفيرويد. هناك عزلات عديدة من IIb يجب أن يحدد تتابعها وتقارن لتحديد تأثير تغير التتابع على المرضية فى أنواع الحمضيات المتشابهة. إن دراسة التتابع يمكن أن

تؤدى إلى توضيح الصفات الحيوية المختلفة فى IIa و IIb فى عوائل الحمضيات المتشابهة. إن IIb و HGda على الرغم من حجمهما المتشابه فإنهما يمتلكان صفات بيولوجية مختلفة وأن هذين الفيرويدين تتشارك فى ٩٦٪ من تماثل التتابع. بسبب الحجم وتشابه التتابع بين HGda و IIb فمن الممكن الآن التمييز بينهما على مستوى النيوكليتيدة.

أما فيرويد IIb والذى هو فيرويد ككسيا للحمضيات فإنه يتكون من ٢٩٩ نيوكليتيدة (شكل ٤١)، والذى هو نفس طول تنوعات HSVd الخاصة بالحمضيات والمرافقة تقزم الكريب فروت الذى ذكر فى اسرائيل. (فى دراسة Duran - Vila سنة ١٩٨٨ ذكر بأن IIa فيه ٣٠٥ نيوكليتيدة وإن IIb فيه ٣٠٠ نيوكليتيدة). إلا أن تتابع النيوكليتيدات فى IIa و IIb تختلف عن تنوعات HSVd الخاصة بالحمضيات المعروفة فى اليابان والتى تسمى CV_1 و CV_2 وذلك باختلاف مواقــع ثلاثة قواعد C - G فى موقع ٢٣، G - A فى موقع ٢٦ و A - G فى الموقع ٢٥١. أما IIb تختلف عن IIa عن طريق إختفاء G من الموقع ٥٨ و A من الموقع ١٠٩ و ١٢٢. كذلك فإن IIb تختلف أيضاً عن IIa فى مواقع قواعد مستبدلة A - G فى موقع ١٠٧ و U - C فى موقع ١٩٣. أما تنوعات HSVd المترافقة مع عامل تقزم الكريب فروت (HGda) ذكر أن بها ٢٩٩ نيوكليتيدة فى الطول وتشارك أيضاً نفس القواعد المستبدلة من G - A عـلى موقع ٢٦ فى IIa و IIb. أما HGda فيختلف عن IIa و IIb عن ولكنه مشابه لتنوعات HSVd من اليابان عن طريق بقاء C على موقع ٢٣ و A على موقع ٢٥١. إن HGda مشابهاً لـ IIb عن طريق بقاء القاعدة المحذوفة G على موقع ٥٨ ولكن يختلف عن طريق بقاء A فى موقع ١٠٧، ١٠٩ و ١٢٢ وبقاء U فى موقع ١٩٣. إن HGda يختلف عن جميع ما ذكر سابقاً من فيرويدات الحمضيات عن طريق إختفاء C من موقع ٢٤٦، U من موقع ٢٤٧ واستبدال A - G فى موقع ٢٧١.



شكل رقم ٤١ :

التتابع الكامل لنيوكليتيدات فيرويدات الحمضيات IIa وككسيا، IIb. تنوع فيرويد تقزم حشيشة الدينار للحمضيات CV_1 وCV_2. إن تنوع فيرويد تقزم حشيشة الدينار من الكريب فروت مرافق مع عامل تقزم الكريب فروت HGda من اسرائيل. العلامات تدل على:

⇕ = الاختلافات بين CV_1 و CV_2. أما(^) = الاختلافات فى تتابع HGda الذى لا يوجد فى الفيرويدات الأربع الأخرى.

* =إختلافات CVd - IIa و CVd - IIb مع CV_1 وCV_2.

↓ = ازالة من تتابع CVd - IIb عند مقارنته مع CVd - IIa.

+ = استبدال فى تتابع CVd - IIb عند مقارنتها مع CVd - IIa.

↑ = إختلاف بين HGda عند مقارنتها مع CVd - IIb.

مجموعة CVd - III :

إن تحليل عزلات الاكسوكورتز فى كاليفورنيا واسبانيا أظهر أن ٣٣ من أل ٣٧ عزلة مختبرة تحتوى فيرويدات ذات حركة فى الهجرة الكهربائية مشابهة لـ RNA - III. بتحليل عزلتين كل منهما لفيرويد مفرد من كاليفورنيا أظهر أن هذين الفيرويدين هما CVd - IIIa و CVd - IIIb وهما ذاتا حجم نموذجى ومماثل لـ ٢٩٠ نيوكليتيدة. الاستبعاد المستمر من CF - 11 cellulose، أدى إلى التعرف بأن CVd - IIIa هو أول فيرويد إستبعد بمادة إيثانول ٢٥٪، فى حين أن الفيرويد CVd - IIIb إستبعد باستعمال ٢٠٪ إيثانول. كان هناك فيرويدين آخرين هما CVd - IIIc و CVd - IIId حيث عزلا ونقيا من معقد عزلات من إسبانيا كان لهما معدل هجرة أسرع من CVd - IIIa و CVd - IIIb وثم إستبعادهما من CF - 11 cellulose باستعمال ٢٠٪ إيثانول كما فى جدول رقم ٢٩.

عند حقن الأترج بعينات نقية من CVd - IIIa، IIIb، IIIc أو IIId أظهرت تقزم معتدل ودرجات متعددة من تدلى الأوراق، نكروزز فى العرق الوسطى ونكروزز فى عنق الورقة. هناك فيرويدات مفردة أمكن استرجاعها ثانية من الأترج بعد الحقن بثلاثة شهور. لا يوجد عوائل أخرى غير أنواع الحمضيات يمكن أن تصيبها فيرويدات مجموعة CVd - III.

مجموعة CVd - IV :

هناك عزلة واحدة مفردة تسبب أعراض بسيطة إلى متوسطة مصدرها كاليفورنيا (E 80) تحتوى فيرويد CVd - IV وهى ذات هجرة كهربائية أكثر سرعة من أى عزلة فيرويدية من أى مصدر من الحمضيات لوحظت حتى سنة ١٩٨٨. إن الهجرة الكهربائية Co - electrophoresis لهذه العزلة مع عينات من CVd - III بها عزلات، أدت إلى القول بأن CVd - IV لها معدل هجرة أعلى من مجموعة CVd - III. قدر حجم الجزئ فى هذه المجموعة بحوالى٢٧٥ نيوكليتيدة. إن مجموعة CVd - IV أظهرت عدم التجانس مع منقبات مجموعة CVd - I و II وIII وأظهرت تجانس ضعيف مع CEVd cDNA.

عند حقن الأترج بتحضيرات نقية من CVd - IV أظهرت أعراض تقزم بسيط، نكروزز فى العرق الوسطى وتدلى الورقة. أما عند حقن نباتات الخيار فلم يظهر أية أعراض عليها، ولكن يمكن استرجاع الفيرويد ثانية خلال ٣ أسابيع بعد الحقن. يمكن أن تصنف مجموعة CVd - IV مع تلك الفيرويدات التى تزاح أو تستبعد من السليلوز فى ٢٥٪ STE ethanol.

العلاقة بين فيرويدات الحمضيات

Relationship Among Citrus Viroids

عند حقن أشجار الأترج (السترون) بمزارع فيرويد نقى أو مخلوط فيرويد صناعى من فيرويدات الحمضيات، فإن جميع الفيرويدات تتناسخ مستقلة بذاتها، ولقد تأكد ذلك بواسطة التحليل بطريقة PAGE للنباتات المحقونة.

إن دراسة الأعراض المحدثة بواسطة خليط من المعديات الفيرويدية ومقارنتها مع الأعراض المحدثة بواسطة فيرويدات مفردة أدى إى القول بحدوث تفاعلات حيوية أو تعاون Synergism بين هذه الفيرويدات. فمثلاً الأترج المحقون بالفيرويد- CVd Ia، IIa و IIId أظهر تقزم بسيط إلى متوسط وتجعد شديد فى الأوراق عادة ما يكون مترافق مع الإصابة بفيرويد CEVd، بالإضافة إلى تدلى الورقة وتجعد عنقها وظهور نكروزز على نصل وعنق الأوراق وهذا ما توصف به مجموعة CVd - III و CVd - I، وتختلف عن الإصابة بفيرويد CEVd فى كون الأعراض تتمثل فى صغر حجم الورقة، بينمـا أنصال الأوراق فى النباتات المصابة بكل من CVd - I وII و III كل على إنفراد كانت مشابهة لنباتات الكنترول غير المحقونة.

إن اللقاح الفيرويدى (المصدر الأصلى من كاليفورنيا E 821) والذى يحتوى CVd - Ia، IIa، و IIb و IIIb تحدث أعراض شديدة نوعاً ما مشابهة لتلك المحدثة بواسطة السلالات الشديدة المحتوية CEVd. هذه الأعراض كانت أيضاً أكثر شدة مما يمكن توقعه من إتحاد الأعراض المحدثة بواسطة كل واحد من هذه الفيرويدات

المشتركة، زيادة على ذلك حتى تحت ظروف الصوبا الزجاجية فإن الأعراض تزداد بشدة كبيرة خلال ظروف الصيف أو درجات الحرارة الأعلى وذات النهار الطويل، بينما النموات الحديثة النامية تحت ظروف الشتاء أو درجات حرارة أبرد ونهار قصير، يمكن أن تكون حاملة للفيرويد ولكن بدون أعراض، وبالمثل فإن الأعراض المرافقة لكل من CVd - IIIa و CVd - IV عند حقنها فى الأترج كل على إنفراد أدت إلى تفاعل بسيط غير مشابه أبداً للأعراض المتوسطة المحدثة بواسطة عزلات كاليفورنيا E 804 التى تحوى كلا الفيرودين.

مقالة العالمين Semancik و Duran - Vila عن فيرويدات الحمضيات* :

إن التحليلات المقارنة بين عينات من الحمض النووى المأخوذ من الأترج المحقون بمصادر حقلية عديدة مصابة بالفيرويدات قد أظهرت وجود الإنتشار الواسع لعديد من فيرويدات الحمضيات المميزة. إن فيرويد CEVd قد عرف ووصف وصفاً تاماً وذكر بأنه يتكون من ٣٧١ قاعدة نيوكليتيدة وقد اكتشف اصلاً من أشجار الحمضيات التى تظهر أعراضاً شديدة من التقزم وتقشر القلف. إن العوامل المسببة للأعراض المتوسطة والبسيطة على الأترج قد اكتشفت وعرفت حديثاً.

كذلك فإن ظهور الأعراض المتوسطة والبسيطة على نباتات الأترج المحقونة قد ثبت بأنها مترافقة مع واحد أو أكثر من الفيرويدات الأصغر من فيرويد CEVd. إن التحليل بطريقة PAGE والانجذاب على الكروماتوغرافى السليلوزية CF - 11، والمدى العائلى والتهجين الجزيئى قد دعم فكرة تقسيم فيرويدات الحمضيات إلى خمسة مجموعات. كذلك فإن ظهــور الأعراض التى يحدثها كل فيرويد أو مجموعة فيرويدات عند حقنها فى نباتات الأترج، أيضاً قد دعمت هذه الفكرة.

* ملاحظة «هناك علماء كثيرون درسوا فيرويدات الحمضيات هم ١ ـ N. Duran - Vila ٢ ـ C.N. Roistacher ٣ ـ R. River - Bustamant ٤ ـ J.S. Semancik ٥ ـ R. Flores ٦ ـ J.M. Belles».

إن الاصطلاح المستعمل والذى يذكر فيه اسم فيرويد الحمضيات فقط، فإن هذا لا يدل على فيرويد معين، لذا يجب أن يكون اسم فيرويد الحمضيات CVd متبوعاً برقم المجموعة التى ينسب إليها وحجمه النسبى داخل المجموعة، حيث أن المجموعات أعطيت أرقاماً I، II، III و IV وضمن هذه المجموعات أعطيت نسباً لحجم الفيرويد مثل a ، b، c، d. هذه التعبيرات، الأرقام والحروف يجب أن تقترن باسم كل فيرويد للحمضيات ويستمر ذلك حتى يثبت له اسم غير هذا الاسم، كما حاول بعض العلماء فى اسرائيل أن يثبتوا ذلك بالنسبة لفيرويد CVd - Ib. لذلك عند ذكر اسم فيرويد معين بأنه العامل المسبب لمرض مميز فيجب أن يضاف إليه اصطلاح وصفى أكثر إيضاحاً. وبالتالى فإنه لغاية سنة ١٩٩١ فإن فيرويد إكسوكورتز الحمضيات وفيرويد ككسيا Cachexia فقط يمكن أن يشار إليهما كمسببات أمراض منفصلة.

إن فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd والتنوعات القريبة جداً له ذات ٣٧١ – ٣٥٧ نيوكليتيدة والتى وصفت من قبل Visavader و Symon سنة ١٩٨٣، ١٩٨٥ تشكل مجموعة مستقلة من فيرويدات الحمضيات. هذه المجموعة تشمل العوامل المسببة المرضية لمرض اكسوكورتز الحمضيات وكذلك الأمراض المشابهة جداً له ولا تميز عنه إلا بشئ بسيط، وتشمل العوامل التى تظهر صفات مشتركة وتشابه فى حجم الجزئ والمدى العائلى والتماثل المتقارب فى التتابع. وبالتالى فإن مجموعة فيرويد اكسوكورتز الحمضيات يصعب التمييز بين عزلاتها أو سلالاتها إلا بالاختبارات الحيوية وإتباع طرق العزل المختلفة وسنذكرها فى آخر المقال.

أما مجموعة CVd - I فإنها تشمل فيرويدين من فيرويدات الحمضيات أصغر من فيرويد اكسوكورتز بمقدار ٣٠ ـ ٤٠ نيوكليتيدة، وهما CVd - Ia و CVd - Ib. هذين الفيرويدين لهما حجم جزيئى يقارب ٣٣٠ ـ ٣٤٠ نيوكليتيدة ودرجة عالية من تماثل التتابع وتحدث نكروزز على العرق الوسطى للورقة يكون بسيط جداً

وذلك عند حقنها فى نباتات الأترج. ومن المحتمل أن الفيرويد الأصغر وهو- CVd Ib والذى وجد لغاية الآن فى عزلة من CVaVd فى كاليفورنيا يمكن أن يمثل تنوع غير معتبر من الفيرويد CVd - Ia.

إن التقرير الأولى عن فيرويد يرمز له (CVaVd) كفيرويد متميز بسبب إحداثه تفاعل متوسط شبيه بالاكسوكورتز على الأترج كان قد بنى على الاكتشاف الذى حدث لفيرويد جديد يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيدة عن طريق الصبغ بمادة برومايد الايثيديوم. الاسم المذكور Citron Variable Viroid كان قد إبتكر لوصف الطبيعة المتغيرة لتعبيرات الأعراض التى تنتج تحت ظروف بيئية مختلفة. وفى إعادة التحليل لعزلة CVaVd فقد تبين أنه بالإضافة إلى الفيرويد ذو ال ٣٣٠ نيوكليتيدة الأكثر انتشاراً فإن هناك ثلاثة فيرويدات أخرى أمكن اكتشافها فى عزلة CVaVd. ونظراً لأن الاسم المعطى للفيرويد Citron Variable Viroid كان قد بنى على تعبيرات حيوية معينة للعزلة التى تحتوى تركيب يتكون من أربعة فيرويدات مميزة، فيبدو الآن أنه من غير الملائم إظهار أى من هذه الفيرويدات الأربعة كعامل مسبب للتعبيرات المرضية بدون إختبار جميع احتمالات الاتحادات لمكونات CVaVd. زيادة على ذلك فإن الحقن بتحضيرات نقية من فيرويد يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيدة يحدث تفاعل أعراض توصف بأنها إنحناء فى الأوراق هذا يشبه CVd - Ia. مع هذه المعلومات الجديدة عن عزلات CVaVd فنحن نقترح أن الاصطلاح الخاص وهو CVaVd يجب التخلى عنه وأن الفيرويد الذى يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيدة لعزلة CVaVd يجب أن يعرف على أنه CVd - Ib.

إن الفيرويدات الأصغر التى تهاجر بسرعة أكثر من مجموعة CVd - I الموجودة والتى تظهـر دائماً وكأنهـا سلسلة متصلة لحدوث الفيرويدات طبيعياً، هـذه الهجرة الكهـربائية المتقـاربة جـداً جعلت تمييز مجموعات CVd - II، CVd - III وCVd - IV من الصعوبة بمكان. مع ذلك فإن مجموعة CVd - II يمكن تمييزها

ببعض الصفات مثل خصائص الانجذاب للسيليلوز CF - 11، الأعراض المحددة جيداً على الخيار والدرجة العالية من تماثل التتابع فى النيوكليتيدات. إن العلاقة بين مكونات هذه المجموعة وأمراض الاكسوكورتز والككسيا فى الحمضيات قد ذكرناها بالتفصيل فى مقال آخر. زيادة على ذلك فإن العلاقة القوية مع فيرويد تقزم حشيشة الدينار Hop stunt Viroid (HSVd) وفيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار والفيرويد الجديد الذى عزل من الأترج وعلاقته مع HSVd كل ذلك له تأثير كبير فى تحديد فيرويدات الحمضيات.

هناك فيرويدات عديدة تهاجر فى d PAGE فى المنطقة الضيقة المحددة بواسطة CVd - II (حوالى ٢٩٠ ـ ٣٠٠ نيوكليتيدة) ومجموعة CVd - IV (حوالى ٢٧٥ نيوكليتيدة). إن الأعراض المميزة لتجعد عنق الورقة متبوعاً بحدوث نكروزز والتى تظهر بوضوح على نبات الأترج المحقون بمجموعة CVd - III يمكن أن تستعمل كمميزات أولية للمجموعة CVd - III. إن جميع أفراد هذه المجموعة تحدث درجات مختلفة من تجعد عنق الورقة ونكروزز حيث أن هذا النكروزز بعد ذلك يمتد ويصل إلى العرق الوسطى ويصبح واضح بدرجة كبيرة وأحياناً يؤثر على العروق الثانوية. كذلك فإنها تسبب تدلى الورقة ويظهر على الورقة بشكل عام مظهر الورقة الساقطة وذلك نتيجة لانحناء عنق الورقة، كل هذه الأعراض تظهر فى نباتات الأترج. إن المدى العائلى لهذه الفيرويدات يمثل بشكل محدود فى الحمضيات، وهى لا تظهر تماثل تتابع مع مجموعات CEVd، CVd - I أو CVd - II.

إن النتائج الأولية لإختبارات تماثل التتابع لمجموعة CVd - III يدل على أنها مجموعة متماثلة خاصة مميزة. ولكى نحصل على صفات أخرى كثيرة متوقعة لهذه المجموعة يجب إجراء إختبارات تهجين أخرى. نظراً لأن هذه الفيرويدات تدخل أو تتواجد بعيار منخفض فى الأترج المصاب فإن إختبارات التماثل لا يمكن إجراؤها ما لم يتوفر كميات كافية من هذه الفيرويدات.

أما فيرويدات المجموعة IV فهى ذات هجرة كهربائية أسرع من كل المجموعات السابقة، وبالتالى فإنها تكون ذات فيرويدات أصغر ويمكن القول بأنها أصغر الفيرويدات التى تصيب الحمضيات وهذه المجموعة تحتوى فرد وحيد (لغاية ١٩٩٠) هو الذى يمثل هذه المجموعة. إنه يشارك فى بعض صفات CEVd أكبر فيرويدات الحمضيات. إن نبات الخيار هو العائل الشائع الذى يحمل الفيرويد IV ويتكاثر فيه بدون إحداث أعراض ظاهرية (أيضاً يشبه تفاعل CEVd مع الخيار). إن المعلومات المتحصل عليها من عمليات التهجين تدل على قليل من تماثل التتابع. وعلى أية حال فإن الأترج المحقون بتحضيرات نقية من CVd - IV تظهر أعراض تدلى الورقة العشوائى ونكروزز فى العرق الوسطى ولكن لا تظهر التقزم الشديد ولا تجعد الورقة التى تميز الإصابة بالفيرويد CEVd.

نعود الآن لمجموعة CEVd والتى وعدنا أن نتكلم عنها فى بداية هذا المقال. لقد تأكد أن أفراد مجموعة فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd تكون مترافقة مع مرض الاكسوكورتز كما ذكر لأول مرة سنة ١٩٤٨ من قبل العالم Fawcett & Klotz. إن الفيرويد المعروف جيداً والذى يتكون من ٣٧١ إلى ٣٧٥ نيوكليتيدة يمكن أن يعزل من أشجار الحقل المظهرة أعراض الاكسوكورتز المميزة. ونظراً لأن معظم مصادر الحقل تحتوى واحداً أو أكثر من الفيرويدات بالإضافة إلى CEVd، فإن السؤال الذى يبرز الآن هو هل CEVd بنفسه هو المسئول عن مجموعة الأعراض المرضية الكلية؟؟. لا يمكن تحديد ذلك بشكل كامل.

إن الأشكال البسيطة من المرض التى تتميز عن طريق تقشر القلف وبدون تقزم أو يكون هناك تقزم بدون تقشر للقلف، هل هذه الأعراض راجعة بسبب الإصابة بالفيرويد CEVd لوحده أو أنه غير مسئول لوحده فى الحقل عن هذه الأعراض أو هل هناك فيرويدات من مجموعات الحمضيات الأخرى تشارك فى ذلك؟؟. هذا السؤال يحتاج إلى دراسات كثيرة تطبيقية فى الحقل.

هناك تجارب على عوامل التقزم القابلة للانتقال بالتطعيم Graft - transmissi-ble dwarfing agents قد حصلنا على نتائج منها، هذه النتائج أظهرت أنه لا يوجد عزلات محددة مسببة للتقزم البسيط أو المتوسط موجودة ضمن CEVd ولكن ضمن فيرويدات أخرى، هناك فيرويد آخر من الممكن أن ينتقل إلى الأقحوان وبالتالى من المحتمل أن يكون له علاقة مع مجموعة CVd - II. على أية حال فإن وجود التفاعلات الكاملة بين فيرويدات الحمضيات لا تسمح، ما لم يحدد محتوى الفيرويد، باستنتاجات مبنية على مميزات جزيئية لعزلات حقلية. وبالتالى فإنه فقط فى كفاءة الأشجار المحقونة بفيرويدات منفصلة وفيرويدات متجمعة سوف تتحدد علاقة تأثير المسبب وتحديده من بين الفيرويدات المختلفة للحمضيات وأخذ الأعراض بعين الأعتبار فى ذلك التحديد.

وبشكل مختصر يمكن القول بأن المعلومات المتوفرة لدينا تزودنا بالقواعد الكافية لفهم جيد وتحديد لمرض الاكسوكورتز. الأعراض البسيطة لا يمكن اعتبارها دليل تشخيصى لمرض الاكسوكورتز. مع أن الإختبار الحيوى للأترج يمكن أن لا يستخدم لوقت طويل لايجاد إثبات إيجابى لوجود فيرويد اكسوكورتز الحمصيات، إلا أنه يبقى أكثر قيمة لفهرسة العائل لهذا الفيرويد. كما وأن العلاقة بين فيرويدات الحمضيات والتعبيرات الكلاسيكية لمرض الاكسوكورتز الذى يظهر تفاعل على شكل تقشر القلف على الأصول الحساسة يجب أن تكون مقنعة فى الاختبارات الحقلية للفيرويدات المختلفة التى تستعمل كمزارع نقية بالإضافة لاستعمال مخلوط من الفيرويدات فى الحقن.

بعد أن إنتهى هذا المقال العلمى المقدم من أكبر عالمين من علماء فيرويدات الحمضيات فإن المؤلف لا يستطيع أن يقول سوى أن التقدم العلمى السريع وإنتشار أبحاث الفيرويدات فى كل مكان هو الذى يحدد مدى دقة هذه المعلومات ومدى إستمرار صحتها فى المستقبل ودعنا ننتظر.

فوائد الفيرويد «توافق الفيرويدات مع أعراض التقزم القابل للانتقال بالتطعيم»

Association of Viroids With Graft - Transmissible Dwarfing Symptoms

من المعروف أن الفيرويدات والفيروسات تسبب أضراراً كبيرة فى النباتات الاقتصادية تؤدى إلى خسائر كبيرة فلا يوجد أية فائدة منها. هناك استثناءان لهذه القاعدة، الاستثناء الأول هو احتمال التوصل إلى تطبيقات عملية ناجحة فى المقاومة بالتضاد Cross - Protection فى المستقبل القريب أو البعيد، وأما الاستثناء الثانى فهو خاص بالفيرويدات فقط وهو استعمالها فى الحصول على أشجار متقزمة فى الحقل وهذه الأشجار المتقزمة لها فوائد زراعية كثيرة، هذه الفكرة هى موضوع هذا العنوان.

هناك بعض الفيرويدات تسبب تقزم فى الأشجار بدون أن يكون هذا التقزم مترافقاً مع أضرار أخرى، هذا التقزم يكون ذو فائدة عملية للمزارعين، هذه الفيرويدات قابلة للانتقال بالتطعيم وتسمى عوامل التقزم القابلة للانتقال بالتطعيم ومنها سلالات عديدة.

هناك فى منطقة New South Wales فى إستراليا أجريت تجارب على بعض العزلات المأخوذه من عزلات عوامل التقزم القابلة للانتقال بالتطعيم-Graft - transmissble dwarfing agents (GTD agents) والتى تقلل حجوم الأشجار الناتجة من بعض طرز البرتقال الناتجة من برعم **Citrus sinensis** مطعوم على برتقال ثلاثى الأوراق **Poncitrus trifoliata** وبدون أن يكون لها تأثيرات ضارة. مثل هذه الأشجار المتقزمة تكون ذات فائدة إقتصادية حيث أن تكاليف العمليات الزراعية مثل الرش والجمع تكون أقل من تكاليف الأشجار الكبيرة الضخمة، وكذلك فإن الأشجار المتقزمة يمكن أن تزرع بكثافة أكثر وبالتالى تعطى إنتاج أكثر فى السنوات الأولى

من الإنبات، زيادة على ذلك يكون هناك كفاءة أكثر فى الاستفادة من الماء فى الرى والأسمدة. وبالتالى يمكن القول بأن التقزم القابل للانتقال بالتطعيم (GTD) هو عبارة عن تفاعل بين العائل والكائن الممرض تكون النتيجـة فيه لصالح المزارعين.

إن التطبيقات التجارية لهذه العملية GTD قد بدأت فى استراليا ولكن يجب أن لا نأخذها مباشرة بل يجب أن نتأكد من تعريف هذه العوامل الممرضة بالضبط والعوامل التى تؤثر على تفاعلها مع العائل وهل هذه العوامل الممرضة تحدث هذا التفاعل باستمرار دون أن يكون عرضياً وهل الظروف البيئية السائدة لها تأثير فى هذه العوامل أم لا. إذن نحن نتكلم عن هذا الموضوع من ناحية علمية أما من ناحية تطبيقية فى بلادنا أو أى بلاد أخرى فهذا يحتاج إلى أبحاث تقرر ذلك.

إن أعراض التقزم فى أشجار الحمضيات المطعومة على أصول البرتقال ثلاثى الأوراق قد عزيت إلى فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd فى الولايات المتحدة واستراليا وذلك بسبب أن الاكسوكورتز يسبب تقشر قلف الأصل بالإضافة إلى التقزم وكذلك فإنه ينتقل بالتطعيم. وعلى أية حال فإن الأشجار المتقزمة بدون أن يحدث لها تقشير نتيجة الإصابة بالفيرويد قد لوحظت فى استراليا وايطاليا وأمكن نقل هذه الأعراض بالبرعم من الأشجار الاسترالية إلى غيرها بدون أن يحدث أعراض تقشر. إن معظم عزلات GTD المستعملة فى بساتين الفاكهة فى استراليا من النوع الذى يحدث تقزم بدون تقشير.

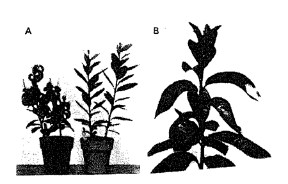
هناك دليل أولى مادى تفصيلى يدل على أن CEVd يكون مترافقاً مع التقزم فى حالة العزلات GTD غير المقشرة. إن خمسة من ستة عزلات أعطت تفاعل تجعد الورقة فى السترون **C. medica** الكاشف لفيرويد CEVd. كما أمكن عزل ستة عزلات من التى تحدث تقزم بدون تقشير للقلف من أشجار البرتقال وتبين بعد النقل المتكرر أنها دائماً مرافقة لأعراض التقزم بدون تقشير. يلاحظ أعراض هذه العزلات فى شكـل ٤٢. ولغايـة الآن لم يحـدد تتابع هـذه العـزلات أو عدد

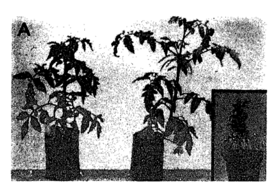
نيوكليتيداتها وهل هى مقتصرة على فيرويد CEVd لوحده فقط أم أنها مشتركة مع فيرويدات أخرى من المجموعات المختلفة لفيرويدات الحمضيات. هناك عزله واحدة تسبب التقزم والتقشير معاً.

إن نتائج هذه الأبحاث تدل على أن الفيرويدات تكون دائماً مترافقة مع التقزم فى أشجار البرتقال. وقد وجد أن بعضاً منها يسبب أعراض تجعد الأوراق فى السترون (الأترج). أحياناً فإنه يمكن أن تطعم الأشجار بالبرعم إلا أنها لا تعطى أعراض التقزم المميزة للعزلة، يعود ذلك إما إلى عدم وجود الفيرويد فى جزء البرعم المأخوذ كطعم للأصل أو عدم ملائمة الظروف سواء جوية أو حيوية لتناسخ الفيرويد.

ذكرنا سابقاً أن هناك عزلة تعطى أعراض تقزم مع تقشر على البرتقال ثلاثى الأوراق هذه العزلة أعطيت رقم ٣٣. أما العزلتين ٣٥٣٥ و ٣٥٣٦ فهى تعطى تقزم بدون تقشر ولكن عند حقنها فى السترون تعطى أعراض نموذجية لفيرويد CEVd على السترون و Gynura والطماطم (هذه العزلات الثلاثة تسمى S - isolates) ولكن أعراضها تكون أبسط من أعراض السلالة CEVd - A.

أما الأربعة عزلات الأخرى تسمى M - isolates وهى ٣٥٣١، ٣٥٣٢، ٣٥٣٨، ٣٥٣٩ عند حقنها فى السترون تعطى أعراض تجعد الأوراق البسيطة ويتأخر كثيراً هذا التكشف (تكشف الأعراض) بالمقارنة مع تفاعلات CEVd. هذه العزلات لا تعطى أية أعراض على ال Gynura أو الطماطم. لقد وجد أنه من الصعوبة بمكان تمييز عزلات M - isolates عن بعضها البعض إلا أنها متميزة عن S - isolates هذا يؤدى إلى القول بأنها إما أن تكون أشكال معتدلة من CEVd والتى من الصعب تمييزها عن بعضها البعض أو أنها تتبع فيرويد منفصل عن فيرويد ال CEVd.







شكل رقم ٤٢ السفلى:

تفاعل عزلات S - isolates على الطماطم والجينيورا.

A : نباتات طماطم محقونة بالعزلة 033. أعراض تقزم متوسطة على الشمال أما اليمين غير معامل.

B : نبات جاينيورا محقونة بالسلالة 033 مسببة أعراض تجعد معتدلة.

النباتات الموجودة داخل المستطيل تظهر أعراض الإصابة بسلالة CEVd - A تحت نفس الظروف.

شكل رقم ٤٢ العلوى:

A : نباتات سترون مظهرة أعراض شديدة للإصابة بعزلة GTD على اليسار مقارنة مع نباتات غير مظهرة للأغراض على اليمين.

B : أعراض معتدلة منتجة بالعزلة 3532.

ب - أمراض الحمضيات الفيرويدية

ا - مرض اكسوكورتز الحمضيات (تشقق الحمضيات)

Citrus Exocortis Disease

يعتبر مرض تشقق القلف فى أشجار الحمضيات عالمى الإنتشار ويهاجم البرتقال ثلاثى الأوراق و Rangur ، Citrango وأنواع أخرى من اليوسفى والليمون الحلو، بعض أنواع ليمون الاضاليا و الترنج. إن كلاً من البرتقال وليمون الاضاليا والكريب فروت وأشجار الحمضيات الأخرى المطعومة على أصول حساسة لمرض تشقق القلف تظهر إنخفاضاً فى النمو يتراوح من نسبة بسيطة إلى نسبة تصل ٥٠ ٪ ويخفض الإنتاج بنسبة تصل ٤٠ ٪.

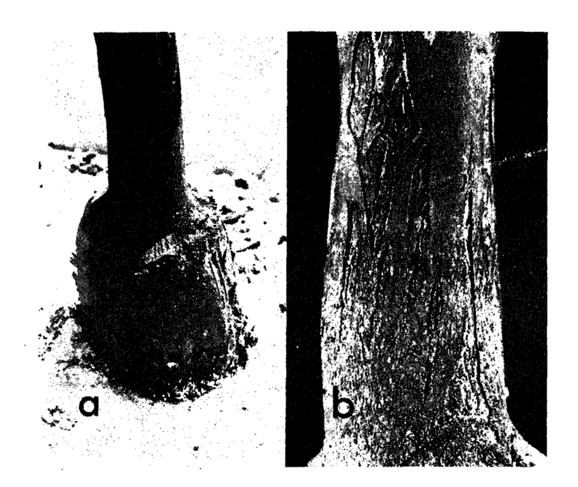
الأعراض:

يظهر على النباتات المصابة الحساسة للمرض تشققات عمودية فى القلف وتكون ضيقة، وتخطيطات رفيعة عمودية على القلف الخارجى المفكك جزئياً والتى تعطى القلف مظهر التقرح أو المظهر الحرشوفى (شكل ٤٣). نظراً لأن كثيراً من النباتات القابلة للإصابة بالمرض مثل البرتقال ثلاثى الأوراق، تستعمل أساساً أصول لتطعم عليها أشجار حمضيات أخرى، وبسبب أن الطعوم تعطى نمو ضعيف على مثل هذه الأصول وبسبب الأصول الحرشوفية واسعة الاستعمال، فإن المرض أعطى اسم القورمة الحرشوفية Scaly butt. إن النباتات المصابة الحساسة للمرض يمكن أيضاً أن يظهر عليها تلطخات صفراء على السيقان الحديثة المصابة، بعض أنواع الترنج يظهر عليها التفاف الأوراق والسيقان إلى الداخل وتشقق واسوداد أعناق وعروق الورقة. تظهر جميع النباتات المصابة، بشكل عام، متقزمة هذا التقزم يتراوح من نسبة بسيطة إلى مدى كبير وتعطى إنتاج منخفض. شكل ٤٤.

الكائن الممرض:

يتسبب هذا المرض عن فيرويد تشقق قلف الحمضيات Citrus Exocortis Viroid ويكتب باختصار CEVd (وقبل سنة ١٩٩٢ كان يكتب بدون إضافة حرف d). يبدو أن الفيرويد يشابه ظاهرياً فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وهو يتكون من حمض نووى RNA ذو خيط واحد يتألف من ٣٧١ نيوكليتيدة أما سلالاته فتتكون من ٣٧٠ ـ ٣٧٥ نيوكليتيدة ويكون ذو وضع (شكل) دائرى أو مستقيم، وهو لا يشابه فيرويد الدرنة المغزلية فى كثير من الصفات.

ينتقل الفيرويد بسهولة من الأشجار المريضة إلى الأشجار السليمة عن طريق سكاكين التطعيم، مقصات التقليم أو أدوات القطع الأخرى. ينتقل بواسطة الأيدى ويمكن أن ينتقل بواسطة الحيوانات القارضة والحافرة. ينتقل الفيرويد أيضاً بواسطة الحامول وينتقل بواسطة العصارة إلى كل من الجنسين **Gynrua** و **Petunia** وإلى نباتات عشبية أخرى. يحتفظ الفيرويد بمقدرته على الإصابة وهو على صفائح السكاكين الملوثة لمدة لا تقل عن ثمانية أيام. عندما ينقى الفيرويد جزئياً فإنه يبقى قادراً على إحداث الإصابة على درجة حرارة الغرفة العادية لعدة شهور. إن درجة الحرارة المميتة لهذا الفيرويد فى العصارة المستخرجة حوالى ٨٠°م لمدة عشرة دقائق، ولكن الفيرويد المنقى جزئياً يبقى قادراً على إحداث العدوى حتى بعد أن يغلى لمدة ٢٠ دقيقة. يبقى أيضاً الفيرويد حياً بتسخين السكاكين الملوثة فترة قصيرة فى اللهب فى مشعل البروبان (درجة حرارة النصل حوالى ٢٦٠°م) وفى السكاكين المغمورة فى الكحول والمسخنة فى اللهب. يبقى الفيرويد أيضاً حياً على السكاكين الملوثة المعاملة بمعظم المطهرات الكيماوية الشائعة باستثناء محلول صوديوم هايبوكلورايت.



شكل رقم ٤٣ :

تقشر القلف والتشقق المتسبب عن فيرويد الاكسوكورتز فى الحمضيات.

A :نمو محدود للبرتقال الحلو وتقشر القلف على أصول برتقال ثلاثى الأوراق.

B : تشقق ساق الليمون الحلو.



شكل رقم ٤٤ :

أعراض فيرويد الاكسوكورتز على السترون ـ الشمـال، سترون غير محقون. أما اليمين، أشجار سترون مصابة بفيرويد اكسوكورتز الحمضيات، يلاحظ التفاف الأوراق ومراحل مبكرة من تشقق القلف.

تكشف المرض:

يبقى الفيرويد حياً فى معظم أشجار الحمضيات وفى كثير من العوائل العشبية وينتقل إلى نباتات الحمضيات عن طريق التطعيم بالبرعم أو أنواع التطعيم الأخرى (التطعيم بالقلم) وينتقل أيضاً بواسطة أدوات القطع الملوثة أو الآلات الزراعية الآخرى. يبدو أن الفيرويد يدخل بوضوح فى عناصر اللحاء وينتشر فيها فى جميع أجزاء النبات. يبدو أن الفيرويد يكون مترافقاً مع الأنوية والأغشية الداخلية من خلايا العائل، وهذا يؤدى إلى اضطرابات فى الأغشية البلازمية. مع أن الفيرويد يبدو وأنه

فاقد القدرة على أن يعمل جزيئات ناقلة messenger molecules أو أن يعمل كحمض نووى مستقل، إلا أنه يسبب تغيرات عديدة فى ميتابولزم النباتات المصابة هذه التغيرات تشمل زيادة فى الأكسجين الممتص وفى التنفس وأيضاً فى محتوى السكريات، وفى بعض الأنزيمات تحدث تغيرات ملحوظة وكذلك أيضاً فى عديد من الأحماض الأمينية.

المقاومة:

يمكن مقاومة مرض تشقق قلف الحمضيات فقط عن طريق إكثار أشجار المشتل الخالية من هذا المرض من أصول مؤسسة مشهود بصحتها وخلوها من المرض واستعمال التطعيم بالبرعم النظيف الخال من المرض. وكذلك المشاتل يجب أن تكون خالية من المرض وإتباع عمليات زراعية نظيفة. يجب أن تطهر الأدوات بين كل قطعتين فى نباتات مختلفة وذلك بغمر الأدوات فى محلول ١٠ ـ ٢٠ ٪ صوديوهايبوكلورايت.

المدى العائلى (الكواشف):

يصيب الفيرويد بالإضافة إلى مدى واسع من أصناف الحمضيات، النباتات الآتية:ـ

1 - Tagetes patula. 2 - Lycopersicon esculantum 3 - Gynura aurantica

4 - Chrysanthemum morifolium 5 - Persea americana 6 - citron medica.

تأثير فيرويد اكسوكورتز الحمضيات على تركيب الأزهار والثمار فى الأترج:

يستعمل نبات السترون (الأترج) **Citrus medica** كنبات كاشف لفيرويد اكسوكورتز الحمضيات. تجرى عملية تكاثر الأترج عن طريق تنمية بادرات

الصنف Arizona 861 وعقل أو نباتات صغيرة مطعومة بالبرعم من طراز S - 1 كلاهما يستعمل باستمرار كاف لتكنيك الفهرسة ولكن فى الوقت الحاضر يفضل إستعمال عقل من S - 1.

إن أعراض الإصـابة بفيرويد اكسوكورتـز الحمضيات على سترون أريزونا 861 أو S - 1 تشمل الإصفرار ثم تدلى الأوراق الحديثة والمتكشفة الجديدة، تفلن العرق الوسطى (يظهر بقع فلينية) والعروق الجانبية الكبيرة على السطح البطنى للورقة ويظهر بقع عمودية مستقيمة على الساق.

فى ربيع سنة ١٩٨٥ أخذت عـقل من السترون S - 1 مصابة بعزلة شديدة من فيرويد اكسوكورتز الحمضيات إحتفظ بها فى الصوبا الزجاجية لأكثر من سنة. هذا الاحتفاظ أعطى فرصة للعقل المصابة بـأن تزهر وتعقد الثمار هذه الحالات لم تلاحظ قبل ذلك. عند فحص وملاحظة تركيبـات الأزهار والثمار فى النباتات المصابة تبين ظهـور أوضاع غير طبيعية فى هذه الأعضـاء لم تكـن ملاحظة من قبل ولـم تذكر المراجـع بأنها ترافـق الإصابـة بفيـرويد اكسـوكورتز الحمضيات.

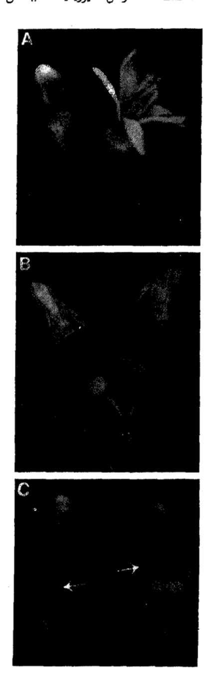
لقد وصف الشكل الخارجى لازهار الحمضيات السليمة وهو ظاهر فى شكل ٤٥. فى الازهار السليمة الطبيعية يتفتح التويج بنظام التفتح القاعدى وتبقى قواعد البتلات ملتصقة مع قاعدة الكأس حتى بعد التلقيح. أما فى النباتات المصابة فإن معظم الأزهار تتميز عن طريق بقاء التويج سليماً قبل أو أثناء أو بعد التلقيح ولا تتفتح البتلات طبيعياً، وبدلاً من التفتح الطبيعى تبقى ملتحمة فى قمة التويج وينطلق التويج بأكمله من القرص الزهرى كلما تكشف وكبر المبيض. تنفصل البتلات عند قاعدة التويج وأحياناً تتسع تدريجياً إلى حد ما بحيث تأخذ شكل النجمة، وبسبب جفاف النصف العلوى من التويج فإنه يشكل غطاء على شكل

فنجان يغطى النهاية القلمية فى الثمار غير الناضجة بحيث يبقى عـدة شهور (شكل ٤٥، B).

مع أنه لا يوجد دراسات تشريحية على هذه الأوضاع، إلا أنه يحدث اضطرابات فى تركيب الزهرة وفى تكشف المبيض ويظهر ثمار ناضجة وأخرى غير ناضجة ولكن كليهما بنضج غير طبيعى. مع أن الكأس فى الأزهار المصابة يظهر وكأنه طبيعى التركيب، إلا أنه يكون أضيق من الوضع الطبيعى وهذا يؤدى إلى الافتراض بأن الكأس يكون أكثر التصاقاً مع الجزء العلوى من القرص الزهـرى شكل (٤٥، c) أكثر مما هو موجود فى الأزهار العادية السليمة. وفى الحقيقة فإن هذا الالتصاق قد يكون محكم جداً ومقيداً للتكشف الطبيعى للبويضات والمبيض. كلما تكاثرت الخلايا وتوسعت تأخذ مكان فى عملية تكوين الهسبريديم الناضج شكل ٤٦ . يبدو أن هذا الانطباق يكون مركزاً على قمة السبلات وبالتالى يحدث تقريباً فى منتصف البويضات أو المبيض إنقباض يكون هذا الانقباض شديد أحياناً وبسيط أحياناً أخرى (شكل ٤٧) ويكون دائماً مساوياً لتأثير تحليق شديد فى الحالات الشديدة. الاستجابة النهائية لتأثير هذا التحليق تكون بحيث تأخذ الثمرة الشكل المشوه بدرجات مختلفة ويكون ذلك على شكل الساعة الرملية (شكل ٤٧) وهو أكثر الأعراض شيوعاً. يكون النصف القلمى للثمرة أصغر من المنتصف الساقى للثمرة وفى بعض الحالات يكون أكثر كثيراً. أيضاً فإن بعض الثمار يكون موجهاً بشكل قائم على المحور، البعض الآخر من الثمار ينحرف عن هذا الوضع القائم عن النصف القلمى ثم تنحنى الثمرة عن المستوى المتعامد. تكون الثمار المصابة بشكل عام أصغر من الثمار السليمة وتميل لأن تأخذ اللون الأصفر قبل النضج. أما الثمار المصابة بشدة يمكن أن تأخذ ربع حجم الثمار العادية. إذا عمل مقطع طولى أو عرضى فى الثمار المصابة يبدو واضحاً أن البويضات تكون قد أصيبت (شكل ٤٨). وعلى أية حال فإن الثمار المصابة تكون صغيرة ومشوهة ويمكن أن تحتوى

أكثر من ١٠٠ بذرة صغيرة بدائية والتى لن تتكشف إلى بذور طبيعية مهما طال بها الزمن. وعلى النقيض من ذلك فإن الثمار المصابة بشكل معتدل عندما تصل إلى طور النضج تصل إلى طول حوالى ١٠ سم ويكون فيها ٢٠٪ من البذور سليمة، هذه البذور تكون جاهزة للإنبات وتنتج نباتات سليمة بدون ظهور أعراض. أما البقية الباقية من البذور والتى هى ٨٠٪ لن تنمو أكثر من ٢ ملم وهذه البذور البدائية لن تتكشف إلى بذور عادية كما سبق وذكرنا. جميع المحاولات التى تبذل لتسهيل إنبات البذور المأخوذة من نباتات مصابة بشدة بفيرويد اكسوكورتز الحمضيات أو بعزلات معتدلة منه فشلت فى إنتاج نبات سواء فى التجارب المعملية أو فى الطبيعة. الثمار السليمة S - 1 يكون فيها عديداً من البذور الحيوية والتى تنمو فعلياً بنسبة ١٠٠٪. وبالتالى فإن توقف نمو البذور فى سترون S - 1 يبدو وأنه مظهر مهم فى تفهم أوضاع البذور الشاذة لأن هذه البذور يجب أن تكون مصابة بدرجة كبيرة وبالتالى فإنها على الأقل تشارك ولو جزئياً فى غياب أو الانخفاض الكبير فى حدوث الانتقال بالبذور للفيرويد CEVd.

إن هذه الأعراض المذكورة سابقاً لم تؤثر على أى نوع تجارى يزرع من الحمضيات ويصاب بالفيرويد CEVd. وفى الحقيقة فإن قوة الشجرة بالإضافة إلى حجم الثمار ونوعيتها لا يبدو بأنها تتأثر عندما يكون الفيرويد موجوداً فى أصول متحملة للمرض. كذلك لم يلاحظ أى من هذه الأعراض المذكورة سواء على أشجار سترون S - 1 السليمة النامية من عقل أو الأشجار المحقونة بفيرويد Citron Variable Viriod والذى تتميز الإصابة به على شكل أعراض على المجموع الخضرى تكون بسيطة، مع ذلك تكون مشابهة للأعراض المنتجة بواسطة CEVd، وبالتالى فإن التعبيرات بالأعراض المرضية المذكورة فى الأزهار والثمار يمكن أن يعتقد بأنها متخصصة بالإصابة بالفيرويد CEVd.

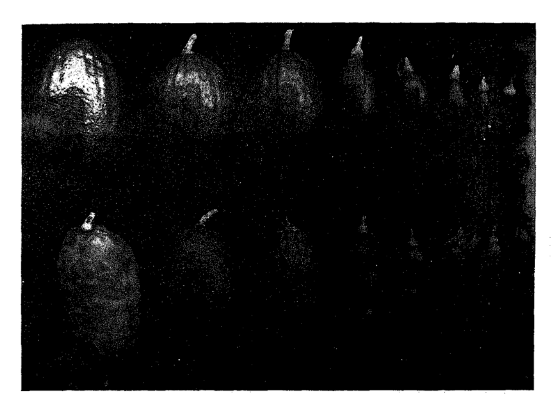


شكل رقم ٤٥ :

A : زهرة سترون سليمة طبيعية.

B : زهرة غير طبيعية للسترون من نباتات مصابة بفيرويد CEVd .

C : المدقة (اليسار) مرتبطة مع الكأس وقاعدة قرص الزهرة غير الطبيعى من زهرة سترون مصابة بالفيرويد وغير طبيعية. (أما اليمين) فإنه نفس التركيب لزهرة سليمة. الأسهم تشير إلى شفة الكأس.



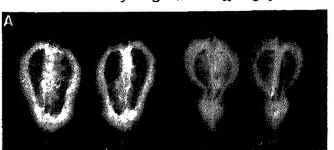
شكل رقم ٤٦ :

العلوى: تطور نمو ثمار السترون السليمة من اليمين إلى اليسار.
السفلى: نفس تطور الثمار ولكن مصابة بفيرويد اكسوكورتز الحمضيات.



شكل رقم ٤٧ :

أمثلة من التشوهات والاضطرابات التى تحدث فى ثمار السترون فى مراحل إصابة مختلفة. تعبيرات مرضية للفيرويد اكسوكورتز الحمضيات.





شكل رقم ٤٨ :

A : مقاطع طولية فى ثمار الحمضيات مصابة بالفيرويد CEVd مظهرة مراحل مختلفة من درجات التشوه ونقص فى عدد البذور وحيويتها مع زيادة شدة التشوه.

B : مقطع طولى فى ثمار سليمة .

التغيرات فى جدار الخلية نتيجة الإصابة المرضية:

تتميز الخلايا البرانشيمية الحديثة فى قمم الأوراق من النباتات السليمة **Gynura aurantiaca** بجدر خلوية ذات مقطع جانبى منتظم وسماكة منتظمة (شكل ٤٩، b) كما ينعكس ذلك بواسطة المقارنة فى (شكل ٥٠). إن جدر الخلية فى مناطق المقارنة فى الأوراق المصابة بالفيرويد CEVd تتشوه بشكل كبير منتجة شكل غير منتظم فى الخلايا فى هذه المناطق من النسيج المصاب. المقاطع الجانبية لجدر الخلية المتناظرة تظهر متجعدة وذات سمك غير منتظم (٤٩، c، a). على المقابل من هذه الجدر الخلوية الشاذة يظهر أحياناً حزم عريضة متوجهة فى منطقة الصفيحة المتوسطة حتى فى الحالات التى يكون فيها جدار الخلية نفسه غير مشوه، هذه التغيرات فى جدار الخلية عادة ما تؤدى إلى تشوه فى التركيب وقساوة فى الخلايا نفسها. كذلك فإن الإصابة الفيرويدية يمكن أن تغير شكل البلاستيدات الخضراء والأنوية.

التغيرات المرضية فى الأغشية الخارجية للبلازمودسيماتا:

Pathological Changes of Plasmalemmasomes

إن ال Plasmalemmasomes سوف نرمز لها بحروف (PMS) هى عبارة عن بروزات من ال Plasmalemma فى السيتوبلازم وتسمى أيضاً الغشاء الخارجى للبلازماليما. وهى تظهر بحيث تكون طبقة من الأغشية مضاعفة وتتكون من

البلازماليما Plasmalemma وتونوبلاست وهذه التركيبات PMS توجد بشكل عام فى جميع أنواع الخلايا الحديثة المتكشفة شاملة عناصر الأنابيب الغربالية ـ القصيبات ـ الخلايا المرافقة والخلايا البرانشيمية فى اللحاء والخشب والخلايا الكولنشيمية فى الميزوفيل والابيديرمز.

قبل أن نتكلم عن تأثير الفيرويد على ال PMS نذكر الوضع السليم لهذه المناطق ثم نقارن ذلك مع الوضع فى حالة الإصابة بالفيرويد.



شكل رقم ٤٩ :

صورة الكترونية للخلايا البرانشيمية مـن نسيـج ورقـة سليمة (b) ومصابة بالفيرويد CEVd شكل (a, c) علـى نباتـات G. aurantiaca . Ch = كلوروبلاسـت، IC= فجـوات بـين خلـوية. N = نواة. V = فجوة فى خلية النبات.

١ ـ ال PMS فى النسيج السليم:

يمكن تقسيم ال PMS بالاعتماد على التركيب الداخلى إلى نوعين مميزين، الأول يسمى حوصلى والثانى أنبوبى، كلاهما موجود فى نبات G. aurantiaca السليم. يتميز النوع الحوصلى بوجود حويصلات داخلية مصفوفة بانتظام، متوسط قطرها ٩٠ نانوميتر وتكون مملوءة بمواد متغايرة بشكل بسيط. تتشكل هذه التراكيب بحيث تكون وسيطات ذات أشكال مختلفة من الشكل الكروى المنضغط أو تتكون بشكل تركيبات منبسطة بين البلازمليما وجدار الخلية وهذه تكون سهلة الاكتشاف. ويمكن أن تكون موجودة بشكل آخر بحيث تكون على شكل طبقات مضاعفة أو مفردة من الحويصلات توجد فى الخلايا الحديثة حيث يلاحظ زيادة فى سماكة الجدار فى الخلية. يمكن أن يظهر فى المقاطع المتسلسلة فى الخلايا أن ال PMS يمكن أيضاً أن تتواجد بشكل منفصل عن جدار الخلية وحرة فى السيتوبلازم.

أما ال PMS الأنبوبية فهى تتصف بأنها مجموعة مفككة من تركيب الأنابيب الداخلية. هذه الأنابيب تكون بشكل عام مصفوفة بطريقة مكثفة ومتوسط قطرها ٥٠ نانوميتر. فى كثير من أل PMS الأنبوبية فإن جزءاً من التركيب الداخلى يصبح مقلوباً إلى كثافة الكترونية وحبيبات Paramural. هذا يعنى أن ال PMS تكون محببة. هذه المادة ذات الكثافة الالكترونية يمكن أيضاً أن تصبح موزعة فوق مساحة كبيرة من البلازماليما وجدار الخلية وهذا يؤدى إلى القول أن ال PMS تكون فارغة وذات تركيب منتكس ببطء. كثيراً من ال PMS تظهر ذات أغشية داخلية عديدة الطبقات.

هناك ملاحظتين يجب الاهتمام بهما فى هذا الموضوع، الأول: ـ إن ال PMS الحويصلية والأنبوبية لا يتواجدان فى وقت واحد فى نفس العينة النباتية. الثانية: ـ ضمن العينة النباتية الواحدة فإن المناطق المختلفة يمكن أن يكون بها إختلافات واضحة فى عدد وتوزيع هذه ال PMS وبالتالى فإن سلسلة من المقاطع الرقيقة يمكن أن تجرى فى المكان وغالباً يصعب اكتشاف ال PMS، إلا أنه بعد



شكل رقم ٥٠ :

صورة الكترونية دقيقة للبلاسماليماسومز الوعائية فى أنسجة سليمة من نباتات **G. aurantiaca** . تكون الأوعية مقفلة فى شكل دائرى (a) الذى يمكن أيضاً أن توجد ضمن السيتوبلازم (b) . فى المناطق التى زاد فيها سمك جدار الخلية تكون الأوعية مرتبة بتضاعف (c) أو طبقات مفردة (d) . CW = جدار الخلية . M = ميتوكندريا ، P = بلازماليما ، Ps = بلاسماليماسوما ، T= تونوبلاست ، V = فجوة .

إجراء عدة مقاطع فإن هذه التركيبات يمكن أن تظهر ثانية ولكن ليس أكثر من ستة منها يمكن أن تلاحظ فى المقطع الواحد. ولكى نحصل على معلومات كثيرة عن هذه ال PMS يكون ذلك فقط إذا أجرى عدد كبير من المقاطع الرقيقة من نباتات مختلفة تحت الأختبار.

أل PMS فى نسيج الورقة المصابة بالفيرويد CEVd :

إن ال PMS فى نسيج الورقة المصابة بالفيرويد CEVd تختلف بشكل كبير فى شكلها وتركيبها الداخلى عن تلك الموصوفة فى الأوراق السليمة. فى جميع الحالات حيث أن التركيب الداخلى الحوصلى يمكن أن يتحقق ويرى بالتجربة فتظهر هذه التركيبات فى الخلايا المصابة بعدم إنتظام واضح فى حجومها ـ شكلها وعددها. بسبب هذه الانحرافات فإن الشكل الكلى لـ PMS يصبح أيضاً غير منتظم.

أما ال PMS الأنبوبية فى الأوراق المصابة يظهر فيها إضطربات كثيرة فى الأنابيب الداخلية والتى يبدو وكأنها مطحونة مع بعضها. العناصر التركيبية يكون لها كثافة الكترونية ثقيلة، وبالتالى فإن ال PMS الأنبوبية المشوهة يكون بسهولة أن ترى قريبة من أكثر جدر الخلية نفاذية وقريبة من السيتوبلازم.

يلاحظ فى كثير من الأحيان نوع واحد من ال PMS مشوهاً فى النباتات المصابة بالفيرويد ويصعب اكتشاف إنتشار التركيبات الداخلية من ال PMS بين البلازماليما وجدار الخلية كما هو فى النسيج السليم. يجب التأكد أنه فى الإصابة الفيرويدية فإن الأوراق الحاملة أعراض يظهر فوق جدار الخلية فيها مناطق تبدو سليمة وكذلك فوق ال PMS، هذا يدل على أنه فى الأوراق ذات مظهر الإصابة العام فإن مناطق من النسيج السليم يمكن أن تتواجد على سطح الورقة.

لا تظهر تغيرات محدثة بواسطة الإصابة الفيرويدية فى تركيب كل من الأنوية، الميتوكوندريا، الرايبوسومات، المكروسومات وجهاز الغشاء السيتوبلازمى. أحياناً فإن

بلاستيدات خضراء مع أجسام غير منتظمة ذات كثافة الكترونية تتواجد فى الأوراق المريضة. ومن المهم أن نذكر هنا أن هذه الانحرافات تمثل أيضاً أكبر الأعراض الخلوية فى نباتات G. aurantiaca المصابة بفيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار.

تأثير الإصابة بفيرويد اكسوكورتز الحمضيات على إنتاج الاثيلين:

إن فيرويد اكسوكورتز الحمضيات يمكن أن ينتقل إلى نباتات الطماطم و Gynura. كلما تقدم المرض فإن الأعراض تتميز بالتقزم وتدلى الورقة وتشوهها. أعراض الإصابة الفيرويدية فى الطماطم تفترض حدوث اضطرابات فى عمليات تنظيم الاثيلين لنمو وتكشف الأوراق. لقد إفترض بأن الاثيلين يدخل فى تكشف استجابة النبات العائل للفيرويدات. لقد وجد أيضاً أن الإصابة بفيرويد CEVd تحدث زيادة فى إنتاج الاثيلين فى نبات G. aurantiaca وكذلك يكون هناك زيادة إنطلاق الاثيلين فى نباتات الطماطم وهذا يتسبب عن زيادة الحث على إنتاج- 1) aminocyclopropane - 1 - carboxylic acid ويرمز له ACC وحيث أن ACC وسيط فى إنتاج الإثيلين كما فى:

Methionine ⟶ SAM ⟶ ACC ⟶ Ethylene

إن مركب SAM هو S - adenosylmethionine.

كذلك فإن ACC يمكن أن يمثل إلى شكل متحول غير طيار Non - Volatil يعرف فى عديد من الأنسجة على أنه N - malonyl ACC. إن أعراض الإصابة والتعبيرات التى تظهرها النباتات المصابة تبدأ من قمة الأوراق المتدلية فى الأوراق القمية والتى لا تلبث أن تتجعد وتتشوه بشدة كلما تدخلت الإصابة الفيرويدية مع عملية التكشف الطبيعية. يمكن تلخيص تأثير الفيرويد على إنتاج الأثيلين فى الآتى:-

١ - إن التفاعل الجهازى لنباتات الطماطم ونباتات Gynura مع فيرويد CEVd يكون متبوعاً بزيادة ليس فقط فى إنتاج الاثيلين ومستويات ACC ولكن

أيضاً يكون متبوعاً بزيادة تجمع أل ACC المتحول كما يحدث فى بناء الاثيلين فى أوراق الدخان المصابة بفيرس موزايك الدخان، الذى يحدث تفاعل الحساسية الفائقة.

٢ ـ إن تشجيع بناء ال ACC يمكن أن يعتبر نتيجة للزيادة الثابتة فى إنتاج الاثيلين، هذا الثبات يكون فى المستوى المضطرد من ACC الحر ومن زيادة تجمع ACC المتحول.

٣ ـ إن زيادة تجمع ACC المتحول يؤدى إلى القول بأن هذا يكون أقل هجرة من الزيادة الكبيرة فى كمية ACC المنتجة بواسطة الإصابة الفيرويدية.

٤ ـ خلال الأعراض المبكرة يزداد بناء ال ACC ويبقى ثابتاً خلال تشكف الأعراض ولكن لا يكون هناك إختلافاً فى كفاءة الانقلاب فى ال ACC إلى أثيلين بين الأنسجة السليمة والمصابة بالفيرويد.

٥ ـ فى أوراق نباتات الطماطم المظهرة أعراض جهازية للإصابة بالفيرويد يكون هناك تشجيع على إنتاج مستويات عالية من ACC وتشجيع على إنتاج الاثيلين فى نسيج ورقة الطماطم.

٦ ـ الفيرويد CEVd يسبب زيادة فى إنتاج ACC فى أوراق الطماطم ويسبب تشوهات فى جدار الخلية وتغير فى تركيب هذا الجدار ويمكن أيضاً أن يحدث تغير فى الغشاء البلازمى وهذا يكون له دور فى إنتاج ACC حيث ذكر Anderson et al سنة ١٩٨٢ أن أل Cellulysin وبقايا الجدار المهضوم للخلية تستطيع أن تشجع زيادة إنتاج الاثيلين.

علاقة البولى أمين مع الإصابة بفيرويد CEVd وهل يمكن استعمال ال Putrescine فى مقاومة CEVd ؟؟

أجريت تجارب على مستويات البيوترسين Putrescine، سبيرميدين Spermidine والسبيرماين Spermine (وهى أكثر مركبات البولى أمين إنتشاراً فى أنسجة النبات)

فى أنسجة النبات المصابة بالفيرويد CEVd أو المعاملة بنترات الفضة أو مركب الايثافون (2 - chloroethyl phosphonic acid) مقارنة مع النباتات غير المصابة. وكذلك درس تأثير مثبطات بناء الاثيلين أو فعله على مستويات البولى أمين وكذلك تأثير الإضافات الخارجية من البولى أمينز على مجموعة الأعراض المرضية المتسببة عن الفيرويد CEVd ونشاط ال Protease المحدث بواسطة المعاملة بأيونات الفضة فوجد ما يلى: ـ

١ ـ تسبب الإصابة الفيرويدية زيادة فى إنتاج الاثيلين فى نباتات العائل وتشجع تجمع ما يسمى (Pathogenesis related) PR proteins وإن الزيادة فى إنتاج الاثيلين تفوق نقص محتويات ال Putrescine فى النباتات.

٢ ـ معاملة نباتات **Gynura** بمادة $AgNO_3$ أو الايثافون تنتج تأثيرات مشابهة لتلك المحدثة بواسطة الإصابة بالفيرويد CEVd متضمنة زيادة فى إنتاج الاثيلين. إن التأثيرات المشابهة لتأثيرات الفيرويد المتسببة عن أيونات الفضة تعزى لمقدرتها على اطلاق الاثيلين المصنع فى نباتات **Gynura**. إن زيادة إطلاق الاثيلين يقلل كمية ال Putrescine.

٣ ـ هناك تأثيرات مشابهة تنتج بواسطة الايثافون والمركبات المطلقة للاثيلين.

٤ ـ إن مجموعة الأعراض الشبيهة بأعراض الفيرويد والمتسببة عن نترات الفضة فى نباتات **Gynura** قد أوقفت بواسطة مثبطات بناء الايثيلين AVG (amino ethoxyvinyl glycine ومثل amino oxy acetic acid أو Co^{2+} أو بواسطة مثبطات فعل الاثيلين Norbornadiene حيث تمنع استنزاف ال Putrescine بدون أن تؤثر على بناء الايثيلين، هذا يدل على أن العلاقة بين زيادة بناء الاثيلين ونقص البتروسين ليس بسبب المنافسة البنائية لمادة S - adenosylmethionine. وقد وجد أن الاثيلين والبولى أمين تشترك فى بناء ال S - adenosylmethionine ببادئ مشترك فى طريقة بناء الاثيلين والبولى أمين.

٥ ـ يحدث نقص في مستوى ال Putrescine في أنسجة الورقة المصابة بالفيرويد أو المعاملة بنترات الفضة أو الايتافول ولم يكن هناك تأثير معنوى على مستويات كل من Spermidine أو Spermine وهذا يؤدى إلى القول بدخول البولى أمين فى تفاعل العائل مع الفيرويد. إن هذا الخفض فى محتوى إل Putrescine هو خطوة إشارية فى تحويل سلسلة تفاعل تؤدى إلى استجابة النبات للإصابة. هذا يمكن أن يستنتج مما وجد بأن تعويق النقص فى مستوى ال Putrescine خلال الإضافات الخارجية من بعض المركبات تمنع التعبيرات المنتجة بواسطة الفضة والتى تشبه أعراض الفيرويد (مثل تشوه الورقة، تثبيط نمو الجذر، تجمع PR proteins وتشجيع تحليل البروتينات المرافقة مع استجابة النبات).

إن زيادة إنتاج الاثيلين تكون مسئولة عن النقص فى مستوى الPutrescine وهذا قد تأكد مع نتائج الأبحاث التى ذكرت بأن أنزيم-Arginine decar boxylase، الأنزيم الرئيسى المسئول عن بناء ال Putrescine فى النباتات قد تثبط بواسطة الاثيلين بتركيزات فسيولوجية.

٦ ـ إن تكشف الأعراض الشبيهة بأعراض الفيرويد وإنتاج بروتينات متعلقة بالمرضية والزيادة فى نشاط ال Protease المحدث بواسطة أيونات الفضة كلها اوقفت بواسطة الإضافة الخارجية من ال Putrescine.

فى النهاية نستطيع أن نجاوب على هذا السؤال الذى هو عنوان هذه المقالة وهو هل يمكن استعمال ال Putrescine فى مقاومة الفيرويد؟؟ نستطيع أن نقول نعم ولكن الأبحاث المستقبلية هى التى نتائجها ستوافق معنا أم لا.

إحداث بروتينات لها علاقة بالمرضية بواسطة CEVd :

لقد وجد أن البولى ببتايد Polypeptide المرافقة للإصابة الفيرويدية ليست متخصصة بالفيرويد ولكنها تنتج من التغيرات التى يحدثها المرض فى ميتابولزم العائل. هذه الحقيقة شجعت الباحثين على البحث عن بروتينات من الممكن أن يكون لها دور فى الاستجابة المرضية.

لقد أمكن اكتشاف عشرة PR Protiens فى نباتات الطماطم المصابة بفيرويد CEVd واحد منها ذو تأثير حامضى والتسعة الآخرين ذات تفاعل قاعدى. إن هذه البروتينات يمكن إنتاجها بواسطة (باستثناء رقم عشرة C 10) معاملة أوراق الطماطم بنترات الفضة أو بمحلول الايتافون. وهى كذلك تنتج مترافقة مع أعراض التحلل الموضعى والأعراض الجهازية والإصابة الفيرويدية. ولقد ثبت بأن تجمع هذه البروتينات لا علاقة له بتحلل الخلية النباتية أو موتها. كما وأن حقيقة أنه لايوجد PR Protiens فى أنسجة الورقة الملاصقة لتلك المعاملة بالايتافون يدل على أنه لا البروتينات نفسها ولا أية أنواع كيماوية أخرى تشجع تكوين PR Protiens حيث أنها تهاجر من مكان الجرح إلى الأنسجة السليمة بكميات يمكن تقديرها. وبالتالى فإن تأثير الايتافون فى الطماطم موضعى جداً فى حين أنه فى الدخان يكون جهازى، لذلك فإن المعاملة بالايتافون تحدث أعراض شبيهة بأعراض الفيرويد وتشجع تراكم PR Protiens. هذا يؤدى إلى القول بأن الايثيلين داخل فى تكشف تفاعل النبات وتكوين PR - Proteins بعد الإصابة بالفيرويد CEVd واستجابة للمعاملة بأيونات الفضة.

ولقد ثبت بأنه لا يوجد علاقة خاصة بين إنتاج PR Protiens وتفاعل الفيرويد مع العائل، زيادة على ذلك فإن هذه البروتينات كلها تتكون فى النباتات التى وصلت طور الشيخوخة وأنها وسيطات فى إنتاج الايثيلين. بعض هذه البروتينات مقاوم للهضم بأنزيمات Trypsin و chymotrypsin - ♂.

تأثيرات مضاد الفيرويد Ribavirin :

بالرغم من الأهمية الاقتصادية والأضرار التى تحدثها الأمراض الفيرويدية والتقدم الكبير فى علم الفيرويدات إلا أنه لا يوجد طرق علاجية فعالة لمقاومة الإصابة الفيرويدية لغاية ١٩٩٤ (حسب معرفة المؤلف). ظهرت بعض التقارير أهمها إثنان فقط تبحث المقاومة الكيماويـة للأمراض الفيرويدية. الأول بحث فى استعمال بعض المواد الكيماوية فى مقاومة مرض الدرنـة المغزلية هذه المادة اسمها Piperonyl butoxide ويرمز لها ($C_{19}H_{30}O_5$). وكذلك إقترح استعمال مادة putrescine فى

مقاومة فيرويد اكسوكورتز الحمضيات. ولقد ذكر العالم Conejero سنة ١٩٨٢ طريقة فى مقاومة مرض اكسوكوتز الحمضيات تعتمد على استعمال نترات الفضة والاثيلين ولكن لم يكتب لها النجاح لعدة إعتبارات.

أما التقرير الثانى عن المقاومة الكيماوية للفيرويدات تكلم عن استعمال مادة الرايبافارين Ribavirin واسمه الكامل(1 - B - D - ribofuranosyl - 1, 2, 4 - triazol - 3 - carboxamide) - هذا المركب ذو تأثير واسع ضد الفيروسات وقد تبين أن له تأثيراً مثبطاً لتناسخ أعداد ال DNA فى النبات والحيوان وكذلك RNA الفيروسى سواء فى المعمل أو فى الطبيعة. ولقد أجريت دراسة لتحديد مدى قدرة هذه المادة فى حفظ أو التأثير على الإصابة بفيرويد CEVd فى نباتات **G. aurantiaca** .

لقد وجد أن استعمال ال Ribavirin على النباتات المظهرة أعراض إبتداءً من يوم ٢٥ بعد الحقن أدى إلى خفض تدريجى فى شدة الأعراض فى كثير من الأوراق المتكونة حتى تلك المتكونة بحوالى ٣ أسابيع بعد إبتداء المعاملة، أظهرت قليل وأحياناً لم تظهر أعراض. جميع التركيزات المستعملة من أل Ribavirin بين ٣٠ - ١٤٠ ملغ / لتر كانت ذات فعالية متساوية على الفيرويد. أما عند الرش بمادة Tween (كنترول) لم يظهر لها تأثير على تكشف أو نمو النبات (شكل ٥١).

إن الشفاء من المرض وقلة التأثيرات السامة عند المعاملة بال Ribavirin يعود ذلك إلى غياب مكونات بعض البروتينات التى عادة ما تكون مترافقة مع المرض مثل P_2 وP_1 وكذلك غياب أى تغيرات فى سلوك البروتين التى يمكن أن تعزى إلى شدة المرض وإجهاد النبات.

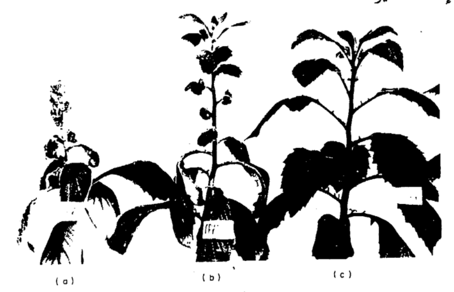
فى تجارب أخرى استعمل فيها ال Ribavirin على النباتات بثلاثة أيام قبل الحقن ففى هذه الحالة فإن هذه المادة أوقفت تكشف أو حدوث المرض وظهرت النباتات سليمة ولم يمكن استرجاع الفيرويد ثانية ولم تثبت له أية حيوية. يمكن أن يفسر ذلك عن طريق عدم وجود زيادة فى ال P_2 و P_1 عديدات الببتايد.

أما المعاملة بتركيزات أقل من ٣٠ ملغ / لتر فإنها لم تكن فعالة، بينما

السمية Phytotoxicity وتقزم وتدلى الورقة تحدث مع المعاملات على تركيزات ١٦٠، ١٨٠ و ٢٠٠ ملغ / لتر.

يمكن تلخيص ما سبق بأن المعاملة بمادة Ribavirin تسبب خفض شديد فى محتوى الفيرويد فى أنسجة العائل. ونظراً لأن الحيوية والمرضية لجزيئات الفيرويد خارج النبات لم تتأثر بواسطة التعريض المباشر لمادة Ribavirin وبالتالى فإن التأثير يكون بسبب تأثير هذه المادة على عملية تناسخ الفيرويد.

مع أن الميكانزم الدقيق لفعل مادة Ribavirin غير معروف بالضبط، إلا أنه يمكن القول بأن فعل هذه المادة يمنع بناء الحمض النووى الفيرويدى عن طريق تثبيط بناء نيوكليتيدات الجوانين Guanine. ونظراً لأن CEVd غنياً نسبياً بهذه النيوكليتيدات Guanosine فمن الممكن تخيل أن ال Ribavirin يؤثر على تناسخ الفيرويد بأكثر شدة من تأثيره على إنتاج الحمض النووى فى العائل. هذا يمكن تأكيده بالاعتماد على حقيقة أن المادة المذكورة تخفض بشدة مستويات الفيرويد بدون إحداث تأثيرات سامة.



شكل رقم ٥١:

استعمال ال Ribavirin فى مقاومة فيرويد اكسوكورتز الحمضيات الذى يهاجم نباتات G. aurantiaca. a = نباتات مصابة غير معاملة، b = نباتات مصابة بالفيرويد ومعاملة بالرايبافارين. c = نباتات غير مصابة بالفيرويد ومعاملة بالرايبافارين. كان يستعمل الرايبافارين رشاً على الأوراق بنسبة ٥٠ ملغ / لتر إبتداءً من ظهور أعلى كثافة من الأعراض على النبات (٢٥ ـ ٣٠ يوم بعد الحقن) ويكرر الرش كل ٤ أيام لمدة ٢٠ يوم.

الوقاية بالتضاد فى فيرويد اكسوكورتز الحمضيات

١ - الوقاية بالتضاد بين سلالتين من فيرويد CEVd :

فى عمليات حصر أجريت لتعريف الصفات البيولوجية لعديد من عزلات فيرويد CEVd أخذت من مصادر حقلية، فتبين أن هناك عزلات تحدث تفاعل شديد من أعراض الاكسوكورتز فى نبات السترون وهو الأترج **Citron medica** مأخوذة من الحمضيات. فى حين أن هناك عزلة من الفيرويد تحدث أعراض معتدلة على نبات **G. aurantiaca** وقد اكتشفت هذه العزلة فى نبات السترون ووصفت بأنها سلالة معتدلة من الفيرويد CEVd على نبات السترون وذلك اعتماداً على حجمها وتماثل قواعدها واعطيت اسم CEVd - 129 .

أجرى إختبار الوقاية بالتضاد بين العزلة CEVd - 129 كعزلة واقية (حافظة) ضد السلالة المتحدية وهى السلالة الشديدة من CEVd على نباتات **Gynura** . وجد أن السلالة المعتدلة من الفيرويد CEVd - 129 يمكن أن تكسب النبات وقاية مظهرية ضد السلالة المتحدية الشديدة. هذا التأثير الواقى يكون على درجات والتى يتراوح بين تأثير بسيط فى إظهار الأعراض من قبل السلالة الشديدة إلى وقف تام لظهور هذه الأعراض. إن مستوى هذه الوقاية يعتمد على طول الفترة بين الحقن بالسلالة المعتدلة والسلالة الشديدة. فى جميع الحالات فإن تأثير حفظ النبات بواسطة السلالة المعتدلة ضد السلالة الشديدة كان مؤقتاً وذلك نظراً لأن الأعراض وتركيز الفيرويد يزداد بشكل كبير بالنسبة للسلالة الشديدة كلما قلت الفترة بين الحقنتين والذى يعكس سيطرة هذه السلالة عند إجراء حقن مختلط من السلالتين فى وقت واحد، لذلك حتى تتم الاستفادة من هذه الظاهرة يجب إطالة الفترة بين الحقنة بالسلالة المعتدلة والسلالة الشديدة، حتى يكون هناك فرصة كافية لتناسخ السلالة المعتدلة.

٢ - الوقاية بالتضاد بين فيرويد CEVd وفيرويد PSTVd :

هناك دراسة لمعرفة تأثير الوقاية بالتضاد بين فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd وفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd. أجريت عدة تجارب

علـى نبات G. aurantiaca ونباتات طماطم L. esculentum حيث حقن النباتين بسلالات شديدة من فيرويد CEVd وسلالات شديدة أيضاً من فيرويد PSTVd ثم لوحظت النباتات واكتشفت الفيرويدات بطريقة PAGE فوجد أنه عندما تحقن نباتات G. aurantiaca بالفيرويدين كل لوحده فإن هذه النباتات المحقونة يظهر عليها أعراض شديدة بواسطة CEVd وأعراض بسيطة بواسطة PSTVd وكذلك فإن CEVd يتجمع بمستوى أعلى منه فى حالة PSTVd، بينما عندما حقنت نباتات الطماطم بالفيرورين كل على حدة فإن كل فيرويد أعطى أعراض شديدة (إلا أن التفاعل كان أكثر شدة وكفاءة بواسطة PSTVd منه فى حالة CEVd) وكذلك فإن مستوى تجمع PSTVd كان أعلى بكثير منه فى حالة CEVd.

عند حقن نباتات G. aurantiaca بالفيرودين معاً فإن الأعراض التى تظهر تكون مميزة للفيرويد CEVd وهو الفيرويد الوحيد الذى يمكن اكتشافه فى النبات. أما عند حقن نباتات الطماطم بالفيرودين معاً فإن الأعراض الملاحظة على نباتات الطماطم تأخذ الأعراض النموذجية للإصابة بالفيرويد PSTVd وهو الفيرويد الوحيد الذى أمكن إسترجاعه ثانية من النبات.

ومن ناحية أخرى عندما حقنت نباتات G. aurantiaca بفيرويد PSTVd أولاً ثم حقنت بعد ذلك بمدة أسبوع بفيرويد CEVd، فإن أعداداً من النباتات أظهرت أعراض مميزة للإصابة الشديدة بالفيرويد CEVd وكلا الفيرويدين كان موجوداً فى المستخلص النباتى وهناك أعداداً أخرى من النباتات أظهرت أعراض السلالة المعتدلة للإصابة بفيرويد PSTVd وهو الفيرويد الوحيد الذى أمكن عزله منها. وعلى أية حال عندما قطعت قمم النباتات المحفوظة بالتضاد فإن الأفرع الجديدة أظهرت أعراض شديدة للإصابة بالفيرويد CEVd فقط وهو الفيرويد الوحيد الذى أمكن اكتشافه فى النبات. هذا يدل على أن كل من PSTVd و CEVd يتنافسان على عوامل محددة فى العائل تلزمهما فى التناسخ والحركة والتجمع وإن CEVd له قدرة تنافس أعلى فى G. aurantiaca من الفيرويد PSTVd والعكس صحيح بالنسبة لنباتات الطماطم عند حقنها بالفيرويد CEVd ثم بعد أسبوع تحقن بالفيرويد PSTVd.

٢ ـ مرض ككسيا فى الحمضيات
Citrus Cachexia Disease

مقدمة :ـ

كان أول ظهور لهذا المرض سنة ١٩٢٨ وكان أول وصف علمى له سنة ١٩٣٤ فى فلسطين وذلك من قبل كل من Reichert و Perlberger على الليمون الحلو **Citrus limettiodes** وكان يطلق على المرض اسم Xyloporosis. يحدث هذا المرض بشكل أساسى على أصول الليمون الحلو وأشجار الشموطى للبرتقال الحلو. الأشجار المصابة تتدهور نوعاً ما وبالتدريج وتصبح غير منتجة خلال بضع سنين. قد يلاحـظ أعراض بسيطة على بادرات الليمـون الحلـو. كذلك فإن المرض يصيب الماندرين Mandarin ولكن لا يصيب الليمـون الحامض والكريب فروت. لوحـظ المرض سنة ١٩٥٢ على أشجار **C. reticulata** المطعومة على **C. paradisi** .

يوجد مسبب المرض فى جميع مناطق زراعة الحمضيات فى العالم وهو أكثر أهمية فى مناطق البحر الأبيض المتوسط وفى بعض مناطق البرازيل والأرجنتين حيث يزرع الليمون الحلو وهو الأصل القابل للإصابة بالمسبب. أجريت دراسات عديدة على هذا المرض فى البرازيل والأرجنتين منذ سنة ١٩٥٧ . ذكر وجود المرض فى جنوب افريقيا سنة ١٩٥٨ . أما فى فلوريدا فكان أول ذكر له سنة ١٩٥٧ .

المرض واسع الإنتشار فى أصناف الحمضيات مثل الليمون الحلو، الماندرين، ليمون الماندرين، التانجالو وليمون **C. macrophylla** . ولقد ذكر أن قليل من بعض

أنواع الليمون الحامض والتانجور وأنواع أخرى من الحمضيات يتكشف عليها أعراض المرض إذا أصيبت بالمسبب المرضى. ظل المرض خطيراً فى كثير من بلدان حوض البحر الأبيض المتوسط حتى تم تغيير أصل الليمون الحلو واستعملت أنواع أخرى من الأصول. يكون تأثير المرض على أصول الليمون الحلو أقل على الأشجار النامية فى الأراضى الخفيفة ولكن بعض الباحثين ذكر فى إسرائل أن لا علاقة للأصل النامية عليه الشجرة بشدة ظهور الأعراض.

مع أنه لا يوجد معلومات كثيرة عن الأهمية الاقتصادية لأضرار هذا المرض، إلا أنه بشكل عام يسبب تدهور كبير للشجرة وضعف عام وإن الحقل الذى يظهر فيه المرض يتلف بنسبة ١٠٠٪ بعد خمسة سنوات من الإنتشار.

الأعراض:

إن تفاعل الحمضيات مع مرض ككسيا يؤدى إلى ظهور مجموعة من الأعراض تتراوح من التنقر البسيط أو المعتدل فى الخشب إلى مرحلة متقدمة من تقشر القلف واضطرابات فى تكوين الخشب، وتشرب الأنسجة المصابة بالتصمغ. من الصعب التمييز بين أعراض هذا المرض وأعراض الإصابة ببعض الفيروسات الأخرى وهذا يؤدى فى كثير من الأحيان إلى أخطاء فى التشخيص وإختلاف فى نتائج بعض الأبحاث. يجب عدم الاعتماد على تنقر الخشب لوحده كعلامة مشخصة للمرض، إلا أن كثير من الباحثين ذكروا بأن أولى الأعراض تظهر على شكل تنقرات فى الوجه الخارجى للخشب مع وجود نتوءات متبادلة على الوجه الكامبيومى فى القلف. يكون لون قاعدة النقرة وقمة النتوء مائل للبنى. هذه الأعراض تلاحظ على الأشجار من صنف الليمون الحلو بعد تطعيمها بالبرعم بمدة سنة. وفى المراحل المبكرة من الإصابة يمكن أن تظهر الأعراض على الأنسجة القريبة من إتحاد البرعم بالأصل. أخيراً تصبح الثقوب ملاحظة بوضوح وينخفض سطح القلف على شكل بقع أو شرائح، وكلما نمت الأشجار، كثيراً ما يظهر نمو غير منتظم (متفاوت) بين الطعم والأصل حيث تأخذ هذه المنطقة شكل

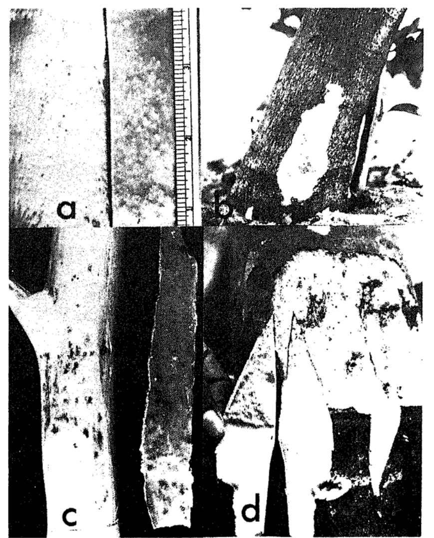
يشبه الركبة، وإن الخشب والقلف القريبان من الكامبيوم، يأخذان اللون البنى خاصة نقر الخشب والنتوءات المتبادلة فى القلف. ولقد فسرت هذه الظاهرة على أن النقر فى الخشب تكون كثيرة جداً وتقع قريبة جداً من بعضها البعض بحيث يبدو الخشب مثقباً على شكل غربال. فى هذا الطور من المرض غالباً ما تصبح الأشجار مصفرة وذات أوراق صغيرة الحجم وتزهر الأشجار بشدة وتعطى محصول ثمار أكثر من الوضع الطبيعى.

يبدأ الطور الثالث من المرض بظهور تلون بنى على بعض المناطق فى القلف، هذه الأجزاء المتلونة تمتد بشكل عام إلى ما يقارب نصف الساق. تلون القلف يكون متبوعاً بالتشقق والأجزاء الملونة من القلف تصبح مائلة للون الأسود تتشقق وتتقشر فى قطع صغيرة. يجف الخشب بالقرب من هذه المناطق ويتحلل ويصبح أسود اللون، عندما يصل المرض إلى هذه المرحلة، أعداداً كثيرة من الأفرع تذوى تدريجياً وببطء حتى تصبح الشجرة كلها قد هلكت. إذا عمل مقطع عرضى فى جذع شجرة ليمون حلو فى هذه المرحلة الأخيرة من المرض يلاحظ بطشاً أو شرائح ملونة وأنسجة غير متعضية فى الأجزاء الخارجية من الخشب شكل ٥٢. يلاحظ أحياناً ترسبات صمغية وتلون فى اللحاء والذى يظهر قبل تشقق القلف أو تسلخه. يمكن ملاحظة بقع صمغية بعد إزالة قطع القلف بشكل خاص فى أشجار Tangelos و Mandarins لا يلاحظ تلون فى اللحاء ولا وجود تصمغات على أشجار الليمون الحلو ولذلك لا يلاحظ تلون اللحاء فى أشجار Tangalos وهذا يعتمد على الصنف.

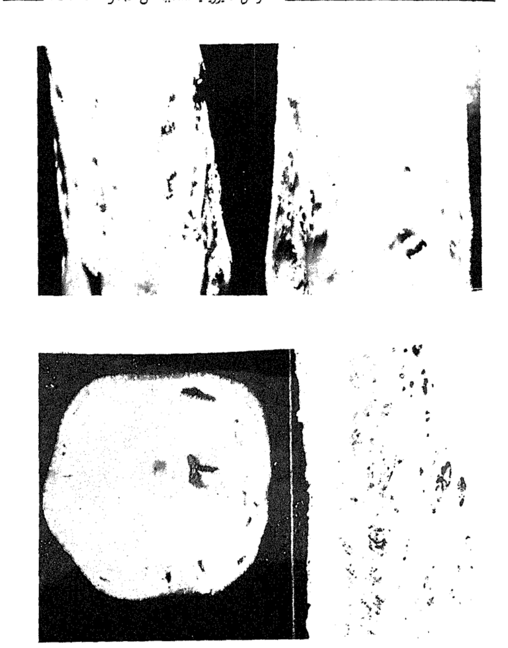
من بين ٤٥ صنف من الحمضيات حساسة للمرض فإن هناك نوعان فقط يتفاعلان مع المرض بدرجاته المختلفة كما فى شكل ٥٣. كما ذكر سابقاً فإن تنقر الخشب لا يستعمل لوحده كعامل مشخص للمرض ولكن تشرب الصمغ فى القلف فى بعض أنواع الحمضيات يمكن أن يتسبب عن الفيرويد وفى حالات قليلة عن بعض الفيروسات.

إنتقال المرض:

إن هذا المرض واسع الإنتشار فى معظم أنحاء العالم. يمكن أن ينتقل عن طريق التطعيم. يمكن أن ينتقل عن طريق البذور وعن طريق الحشرات القشرية.



شكل رقم ٥٢:
أعراض مرض ككسيا فى الحمضيات
A : تنقر بسيط فى الخشب.
b : بداية تقشر خارجى للقلف مظهر تجمع الصمغ.
c : مراحل متقدمة من المرض.
d : تأثير شديد فى منطقة إتحاد الطعم مع الأصل.



شكل رقم ٥٣:

العلوى: الوجه الكامبيومى من جهة الخشب على الشمال والوجه الكامبيومى من جهة القلف فى اليمين كلاهما مصاب بفيرويد ككسيا.

السفلى: مقاطع عرضية وطولية لنبات التانجالو المصاب بفيرويد ككسيا مظهراً الأنسجة غير الطبيعية وترسبات الصمغ فى الخشب.

سبب المرض:

يتسبب هذا المرض عن فيرويد Citrus Cachexia Viroid ويكتب باختصار (CCaVd) وقبل سنة ١٩٩٢ كان يكتب بدون إضافة حرف d. يتبع هذا الفيرويد مجموعة فيرويدات الحمضيات الثانية CVd - II b ويتكون من ٢٩٩ نيوكليتيدة ويستعمل له نباتات الأقحوان، الخيار والأترج نباتات كاشفة. وقد تكلمنا عنه بالتفصيل فى موضوع فيرويدات الحمضيات.

تأثير درجات الحرارة على فيرويد ككسيا:

لقد تبين من أبحاث كثيرة أن الحرارة تؤثر تأثيراً كبيراً على حدوث الإصابة الفيرويدية، بالإضافة إلى الظروف المثلى لنمو الخلايا التى تحتوى الفيرويد فى المزرعة. إن تركيب الفيرويد ليس مقاوم للتثبيط بالحرارة فقط ولكنه أيضاً بشكل عام يتحمل درجات الحرارة المرتفعة الملائمة لتناسخ الفيرويد. هذه الصفات أصبحت تقريباً عوامل تشخيصية لإصابة النباتات بالفيرويد.

إن ملاحظة تأثير الحرارة على تجمع الفيرويد قد أجريت لمعظم الأجزاء فى أنواع النبات والتى تظهر استجابة مرضية للإصابة الفيرويدية. نظراً لأن الأترج يبقى بدون إظهار أعراض خلال الإصابة بفيرويد ككسيا بالمقارنة مع تجمع CEVd، الفيرويد الذى يحدث أعراض تقزم شديدة كإستجابة فى الأترج. عند تنمية نباتات الأترج المحقونة بفيرويد ككسيا والاكسوكورتز فى درجات حرارة من ٢٢ ـ ٣٨°م ثم تنقل إلى حرارة ١٧ ـ ٢٩°م (أقل درجة حرارة وأعلى درجة حرارة تنمو عليها الأشجار)، كان نمو الأترج غير المحقون معوقاً بنسبة ٥٠٪ تقريباً باستعمال نظام درجات الحرارة المنخفضة. كما وأن تحضيرات الحمض النووى من النباتات النامية تحت درجات حرارة منخفضة تظهر DNA Polydispersity فى الجيل أقل من تلك المأخوذة من النباتات النامية تحت درجات حرارة مرتفعة. كان هناك تركيزات أعلى من CEVd فى النباتات النامية تحت درجات حرارة عالية أكثر منه تحت درجات

الحرارة المنخفضة. هذا التفاعل يكون واضحاً بشكل خاص فى الجيل المصبوغ بالايثيديوم برومايد. إن تركيزات فيرويد ككسيا تحت كلا الظرفين تبدو أساسياً متكافئة أو أكثر قليلاً فى النباتات النامية تحت الظروف الباردة. هذه الاستجابة غير شائعة فى كثير من الفيرويدات.

المقاومة:

يمكن إتباع طرق المقاومة المذكورة مع مرض اكسوكورتز الحمضيات فى الصفحات السابقة.

٣ - فيرويدات نخيل جوز الهند

أ - مرض كادانج - كادانج فى نخيل جوز الهند

Cadang - Cadang Disease of Coconut Palm

مقدمة:

كانت أول ملاحظة للمرض سنة ١٩٢٧ منذ الوقت الذى دمر فيه مرض كادانج - كادانج زراعات جوز الهند فى جزيرة San Migual وفى Albay. إعتبر المرض أكثر الأخطار تهديداً لجميع مصانع جوز الهند فى الفلبين. بدأ إنتشار المرض بشكل وبائى سنة ١٩٣٠، ومن بين ٢٥٠ ألف شجرة نخيل جوز الهند، بقيت عدة مئات فقط والباقى كله دمر تحت وطأة المرض. ظهرت أوبئة مشابهة فى مناطق أخرى من Bicol وبحلول عام ١٩٥٦ فإن نصف الأشجار المثمرة فى المنطقة كانت مصابة، وبالإجمال يمكن القول بأن مرض كادانج كادانج قد قتل حوالى ٣٠ مليون نخلة جوز الهند خلال الأربعين سنة الأخيرة فى الفلبين.

كلما ازداد تهديد المرض للمزارعين كلما إرتبطت به أبحاث الباحثين والعلماء للبحث عن مسببه وعن طريقة لحفظ الأشجار السليمة. لغاية سنة ١٩٨٠ نشر عن هذا الموضوع ٢٣٤ بحثاً وذلك بواسطة ١٢٣ باحث. وقد ثبت بأن المرض غامض وصعب الاكتشاف كما أنه مدمر. وبالرغم من الآراء العديدة والنظريات التى ظهرت عن هذا المرض، إلا أنه لم يظهر أى بحث مقنع يؤدى إلى توضيح سليم عن هذا المرض وذلك حتى منتصف السبعينات. وفى آواخر السبعينات ثبت بأن

مرض كادانج ـ كادانج هو مرض فيرويدى وتحدد مسببه وهذا أدى إلى حل مشكلة كبيرة نشأت مع نشوء المرض.

هناك مشاكل عديدة قابلت الباحثين فى هذا المرض حيث استمرت الأبحاث من سنة ١٩٣٠ إلى سنة ١٩٧٦ وقد ذكر كثير من الباحثين أن هذا المرض غامض ومحير. بعد اكتشاف المسبب تبين أن المشاكل التى كانت تقابل الباحثين فى هذا المرض هى: ـ

١ ـ طول الفترة اللازمة للحصول على بادرات من أشجار جوز الهند.

٢ ـ البادرات التى أقل من خمسة سنوات لا يظهر عليها أعراض المرض أبداً.

٣ ـ يصعب اكتشاف الإصابة فى الأطوار الأولى.

٤ ـ تستمر أعراض المرض على الشجرة مدة من ١٠ ـ ١٥ سنة.

٥ ـ يبدأ إثمار الأشجار وهى ذات عمر من ٥ ـ ١٠ سنوات.

٦ ـ تستمر الشجرة تعطى إثمار لغاية ٦٠ سنة على الأقل.

أعراض مرض كادانج ـ كادانج:

يستطيع الشخص المدرب ذو الخبرة أن يعرف بأن الشجرة أصبحت مصابة بهذا المرض عندما تبدأ فى حمل جوزات أصغر وأكثر استدارة (كروية) عن الوضع الطبيعى وذات خدوش أو تشققات شكل ٥٤. أما من النواحى الأخرى فإن الشجرة تظهر سليمة تماماً، وفى الحقيقة فإن عدد الجوزات المنتجة يمكن أن يكون أكثر قليلاً من الوضع العادى، ثم بعد ذلك فإن علامات المرض الأخرى لا تلبث أن تتداعى للظهور. يتكشف على الأوراق بقع صفراء والتى تظهر مائية فى إنعكاس الضوء شكل ٥٥. وهى لا تشبه البقع المتكونة عن الحشرات الماصة ولا البقع الناتجة عن بعض الفطريات، وليس لها مركز بنى، تصبح البقع أكثر عدداً كلما

تقدم المرض معطية ثلثى الجزء السفلى من قمة الشجرة المظهر المصفر بعد مدة من الزمن.

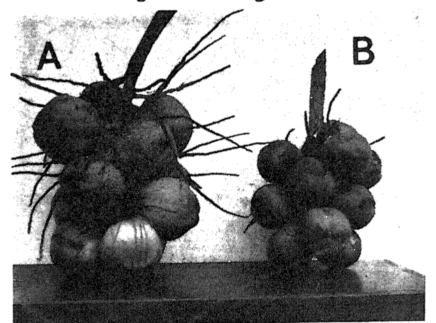
إنتاج الجوزات ينخفض ويتوقف بعد ٢ ـ ٣ سنوات من ظهور أول الأعراض. عناقيد الزهرة (العثاكيل أو الشماريخ) تصبح أصغر وذات قمم سوداء وغالباً ما تفشل فى الخروج كاملة من الغطاء المغلف لها شكل ٥٦. تبقى الألياف عادة متلاصقة مع قواعد السعف، مع أنه فى الأشجار السليمة يكون هذا الليف منفصلاً وبعيداً عن قواعد السعف. كلما تقدم المرض أكثر يصبح السعف أقصر شكل ٥٧. السعف الأكبر سناً فإنه يتدلى قبل أن يكتمل النمو والنضج ويسقط وتصبح قمة الشجرة صغيرة مقتصرة على باقة من السعف الأصفر القصير. لا تلبث أن تموت الأشجار بعد أن تصل هذا الطور. فى كثير من الحالات تتقزم الأشجار بشكل واضح وتظهر الشجرة فى حالة سيئة جداً من حيث قصر الأوراق وتدليها واصفرارها وعدم الإثمار وتموت الشجرة.

أما أعراض المرض الأكثر إنتشاراً فى منطقة جنوب غرب الباسفيك والتى تظهر علـى أشجار نخيـل الزيت ونخيـل جوز الهنـد، تكون الأعـراض على شكل بقع برتقالية على الأوراق والذى يسمـى فى الفلبين التبقع البرتقـالى الوراثى Genetic orange spotting (GOS).

الوقت الذى ينقضى بين ظهور أولى الأعراض وموت الشجرة يتراوح من ٣ ـ ١٥ سنة وبالمتوسط حوالى عشرة سنوات. يعتبر مرض كادانج ـ كادانج من أسهل الأمراض تشخيصاً وذلك بواسطة أعراضه الواضحة وبواسطة بطء تدهور الشجرة، وبالنسبة للمتخصصين بهذا المرض فإن أعراض المراحل المتقدمة للمرض لا تلتبس أبداً مع الأمراض الأخرى أو الاضطرابات الفسيولوجية المختلفة مثل زيادة الرى أو نقص التغذية.

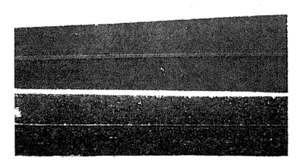
هناك صفة مميزة لهذا المرض وهى أن الأعراض تعتمد على عمر الشجرة.

النخلات (الأشجار) التى عمرها أقل من عشرة سنوات فإنها نادراً ما تصاب وتزداد نسبة الإصابة بالمرض كلما تقدم عمر النخلة حتى يصبح عمرها أربعين عاماً وعندها نسبة احتمال الإصابة تبقى ثابتة بعد هذا السن.



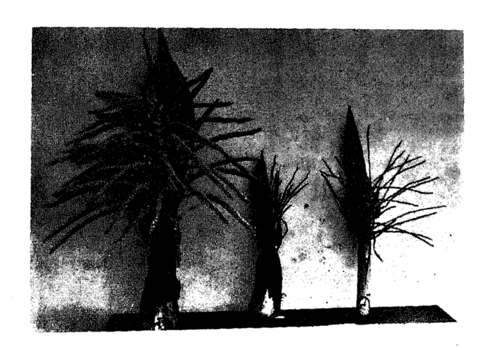
شكل رقم ٥٤:

عناقيد من جوزات جوز الهند. A : سليمة. B : مصابة. يلاحظ الإستدارة وصغر الحجم والخدوش فى الثمار المصابة.



شكل رقم ٥٥:

أعراض البقع المائية فى الأوراق المصابة من نخيل جوز الهند بمرض كادانج ـ كادانج.



شكل رقم ٥٦ :

أعراض مرض كاداغ ـ كاداغ فى النورة فى أشجار نخيل جوز الهند. اليسار سليمة أما الوسط واليمين مصابة يلاحظ اسوداد القمة وعدم خروج عثاكيل الأزهار.



شكل رقم ٥٧ :

أعراض الإصابة بمرض كادانج - كادانج فى نخيل جوز الهند يلاحظ اصفرار وتقزم وصغر قمة الشجرة المصابة مقارنة مع الشجرة السليمة على اليسار.

أصل وإنتشار مرض كادانج ـ كادانج :

من أين أتى مرض كادانج ـ كادانج؟؟. هناك فرضيات تقول بأن المرض نشأ فى جزيرة San Miguel فى بداية الثلاثينات من هذا القرن ثم إنتشر إلى مناطق أخرى وبسرعة وتقدم فى خلال العشرين سنة الأخيرة. وعلى كل حال فإن التقارير القديمة والدراسات الحديثة على إنتشار هذا المرض تعارض وتنكر هذه النظرية. إن أول نشرة عن مرض كادانج ـ كادانج يقول فيها كاتبها إنه فى سنة ١٩٣١ زار منطقة الفلبين ولاحظ أن هذا المرض أكثر أهمية على أشجار جوز الهند فى جزيرة San Miguel وكان المواطنون يسموه مرض كادانج ـ كادانج. هناك بعض الباحثين الذين ذكروا أن اسم هذا المرض كان مؤلوفاً فى أواخر الأربعينات وأوائل الخمسينات بالنسبة للمواطنين. هذه الآراء تبين أن المزارعين حاولوا مقاومة هذا المرض إلا أنهم لم يفلحوا فى ذلك.

هناك أدلة أخرى ضد نظرية أصل نشوء المرض من جزيرة San Miguel وذكر أن المرض كان موجوداً فى جميع مقاطعات Bicol وأنه لم ينتشر من جزيرة San Miguel.

الخسائر الاقتصادية :

إن أكبر خسائر إقتصادية حدثت فى أشجار جوز الهند نتيجة للإصابة بمرض كادانج ـ كادانج كان فى الخمسينات حيث ذكرت الاحصائيات سنة ١٩٦٠ أن مليون شجرة ماتت خلال سنة واحدة فى الفلبين أما الإحصاءات الحديثة سنة ١٩٨٢ تبين أن هناك حوالى ٥٠٠ ألف شجرة تفقد سنوياً من جميع مقاطعات الفلبين.

مسبب المرض:

منذ ملاحظة المرض سنة ١٩٢٧ بدأت الأبحاث لمعرفة مسبب المرض واستمرت حتى سنة ١٩٧٣ وعندها ذكر أن هذا المرض يتسبب عن فيرس وذلك اعتماداً

على طبيعة الأعراض ومقدرة المرض على أن ينتشر بشكل وبائى واستمرار المرض وتقدمه حتى بعد التسميد الجيد وعدم وجود بكتيريا أو فطر ممرض مرافق لهذا المرض. مع أن معظم الباحثين وافقوا على أن المرض يتسبب عن فيرس، إلا أنه لم يكن هناك دليل مقنع بأن هذا المرض معدى بالنسبةلأى من النباتات الأخرى. فشلت المحاولات التى أجريت لنقل مسبب المرض إلى أشجار أخرى سواء بالعصارة أو بالحشرات أو بأى طريقة أخرى.

مع كل هذه الحلقات من الفشل فى الأبحاث إلا أنها لم تؤخذ كدليل على أن المرض لا يتسبب عن فيرس، حيث أن هناك بعض الفيروسات النباتية يصعب اكتشافها بالمكيروسكوب الالكترونى وكثير من الفيروسات النباتية يصعب نقلها عن طريق العصارة النباتية. كذلك استعملت أنواعاً عديدة من الحشرات لنقل المسبب من الأشجار المصابة إلى الأشجار السليمة واستعملت ملايين الحشرات وآلاف البادرات لينقل إليها المرض ولكن لم يثبت نهائياً أن مسبب المرض ينتقل بالحشرات.

بعض الباحثين مثل Petzold سنة ١٩٧٤ ذكر أن هناك كائنات شبيهة بالركتسيا فى برانشيما اللحاء فى الأشجار المريضة ولكن ثبت خطأ هذا البحث ثم إتجه البحث عن النيماتود وعن نقص العناصر فى التربة ولكنها كلها فشلت فى تحديد مسبب المرض.

فى سنة ١٩٧٣ إتجه البحث عن الفيرويد كمسبب لمرض كادانج ـ كادانج وبعد محاولات عديدة وإتباع طريقة PAGE تبين أن المرض يتسبب عن فيرويد. كان أول تقرير عن وجود الفيرويد كمسبب لهذا المرض سنة ١٩٧٥ وذلك من قبل العالم Randles .

أخيراً ثبت أن مرض كادانج ـ كادانج يتسبب عن فيرويد سمى Coconut Cadanig - cadanig Viroid ـ ويكتب باختصار (CCCVd) أو ccRNAs .

جزيئات ccRNAs صغيرة جداً وذات صفات قريبة من صفات فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس. يتكون هذا الفيرويد من جزيئات RNA تكون دوائر مغلقة من RNA ذو خيط واحد وفيها مقاطع عديدة من القواعد المتكاملة والتى تشكل روابط هيدروجينية عبر الجزئ جاعلة الدوائر تنطوى وتعطى شكل ثنائى الخيط إلى حد ما. مثل هذا التركيب لا يوجد إلا فى الفيرويدات والفيروسايدات وغير معروف لأى جزيئات أخرى من RNA وهى تعطى الفيرويد صفات تكون متوسطة بين صفات RNA آحادى الخيط وثنائى الخيط. إن تسخين ccRNA تحت ظروف معينة Formamide يحطم الروابط الهيدروجينية عندئذ تفتح الدوائر ويمكن أن يلاحظ تحت الميكروسكوب الالكترونى. هذه المعاملة أظهرت أنه ليس جميع جزيئات ccRNA دائرية ولكن بعضها مستقيم وله طبيعة تركيب دبوس الشعر.

أشكال فيرويد CCCVd :

بالأبحاث المستمرة على فيرويد كادانج ـ كادانج فى أشجار جوز الهند تبين أن لهذا الفيرويد أربعة أشكال وهى: ـ

١ ـ CCCVd - 1 وهذا له نوعين سريع fast (f) وبطئ slow (s) ويكتب CCCVd - 1 - f أو CCCVd - 1 - s.

٢ ـ CCCVd - 2 وهذا له أيضاً نوعين سريع fast (f)وبطئ slow (s) ويكتب CCCVd - 2 - f أو CCCVd - 2 - s.

وفيما يلى شرح لاكتشاف وصفات هذه الأنواع.

بعد أن تم اكتشاف مسبب مرض كادانج ـ كادانج وتأكد أنه يتسبب عن فيرويد أو حمض نووى ccRNA تسابقت الأبحاث فى دراسة هذا المرض.

باستعمال طريقة التهجين الجزيئى والتى حساسيتها ١٠٠ ضعف حساسية طريقة الهجرة الكهربائية استعملت هذه الطريقة لدراسة ccRNA وتبين أن ccRNA

يتكون من ccRNA - 1 و ccRNA - 2 وإنهما متقاربين جداً من بعضهما البعض وهناك تشابه كبير جداً بينهما فى تتابع القواعد. وفى الدراسات التالية أمكن معرفة التتابع الكامل لقواعد ccRNA - 1 و ccRNA - 2 وأصبح من الواضح أن ccRNA - 2 يمثل ببساطة ارتباط جزئين من ccRNA - 1 فهى تمتلك (٥٠٠ نيوكليتيدة للثانى و ٢٥٠ نيوكليتيدة للأول، إلا أنه ثبت خطأ هذا التقدير) وكذلك تبين أن هناك علاقة قريبة جداً بين ccRNA وفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس حيث أن التركيب الثانوى لكل منهما متشابه جداً. وفى بعض المقاطع فإن تتابع القواعد فى كليهما يكون متماثل وذلك فى منطقة وسط الجزئ.

أظهرت الدراسات الأخرى أن كلاً من ccRNA - 1 و ccRNA - 2 يمكن أن توجد بشكلين مختلفين سمى الأول سريع fast والثانى بطئ slow وذلك بسبب إختلاف سرعتهما فى الهجرة الكهربائية فى الجيل. إن الأشجار المصابة بالمرض فى المراحل المبكرة جداً دائماً تحتوى الأشكال السريعة من ccRNA - 1 وccRNA - 2، بينما الأشجار المريضة فى الأطوار المتأخرة من المرض دائماً تحتوى الأشكال البطيئة. أما الأشجار ذات الأعراض المتوسطة، دائماً تحتوى الشكلين مع بعض، ولكن فى بعض الحالات النادرة يمكن أن تتواجد الأربعة أشكال مميزة فى سعفة واحدة (ورقة النخيل تسمى سعفه). لقد ثبت أن السعفات الحديثة والتى لا تظهر أية علامات للمرض بأنها تحتوى الأشكال السريعة من ccRNA - 1 و ccRNA - 2، بينما لم يكتشف أى من الأشكال السريعة فى السعفات المتقدمة بالسن. كلما تقدمت السعفه فى السن كلما تحولت الأشكال السريعة إلى أشكال بطيئة من الفيرويد (جدول ٣١).

إن التمييز بين الأشكال السريعة والبطيئة من ccRNA مهم جداً وذلك لمعرفة إنتقال المرض.

جدول ٣١ : وجود الشكل السريع والبطئ من ccRNA فى سعفات نخيل جوز الهند المصاب بالمرض.

رقم السعفة على الشجرة من القمة	شكل الفيرويد قبل ظهور الأعراض	شكل الفيرويد عند بداية الأعراض	شكل الفيرويد فى الطور الأول من المرض	شكل الفيرويد فى الطور المتوسط	شكل الفيرويد فى الطور المتأخر من المرض
من ١ ـ ١٢	سريع	سريع	سريع + بطئ	بطئ	بطئ
من ١٣ ـ ١٦	سريع	سريع	سريع	بطئ	بطئ
من ١٧ ـ ٢٢	-	سريع	سريع	سريع + بطئ	بطئ

إنتقال مرض كادانج ـ كادانج والمدى العائلى للفيرويد:

يمكن أن ينتقل المرض عن طريق حقن بادرات جوز الهند بالحقنة الضاغطة لمستخلص RNA منقى من أوراق أشجار مصابة بالمرض. يكون النقل بهذه الطريقة بنسبة منخفضة حوالى ١٧ ٪ فقط. أجرى تحسين على هذه الطريقة حيث تحقن مستخلصات RNA المأخوذة من أوراق ذات إصابة حديثة وحيث أن هذه المستخلصات تحتوى الأشكال السريعة من ccRNA، وهذه الأشكال أكثر عدوى ونشاط فى إصابة الأشجار من الأشكال البطيئة. عندما استعمل ٢ ملغ مستلخص غير مفصل من Unfractionated RNA يحتوى شكل سريع كانت نسبة النجاح فى الحقن ١٠٠ ٪ أما عندما كان يحوى الشكل البطئ كانت نسبة الإصابة ٣٠ ٪ أما عندما كان يستعمل ١,٧ ملغ فيه شكل سريع كانت نسبة النجاح ٣٠ ٪. أما استعمال ١,٣ ملغ يحتوى شكل بطئ كانت نسبة الإصابة صفر٪.

تحقن البادرات بحقنة ضاغطة وذلك لإدخال محلول RNA فى نسيج قمة البادرة حيث بدايات تكشف السعفات. يصعب إجراء الحقن إذا تعدت البادرة سن خمسة سنوات حيث أن قواعد السعفات تغطى على الأنسجة الطرية التى يتم فيها الحقن. بعد عملية الحقن تظهر الأعراض النموذجية بعد ١ ـ ٢ سنة من الحقن

وخلال مدة سنتين من الحقن يبدأ ظهور أعراض التقزم. عادة ما يتوقف إنتاج الجوزات كلية (لأن الشجرة حقنت قبل الإثمار) ولكن فى بعض الأصناف التى تعطى ثمار مبكراً فإن هذه الثمار يظهر عليها أعراض المرض النموذجية. بعد تقدم المرض وظهور المراحل الأخيرة يظهر سعفات قصيرة نموذجية الأعراض وتبقى الألياف ملتصقة مع قواعد السعفات. يكون تقدم المرض بطئ جداً فى الحقن الصناعى أكثر منه فى الحالة الطبيعية.

إن إنتقال المرض فى الطبيعة عن طريق الحشرات الناقلة يبدو أنه أكثر عوامل النقل احتمالاً، مع أن جميع المحاولات التى بذلت لنقل الفيرويد عن طريق الحشرات القارضة أو الماصة فشلت فى ذلك. ولقد وجد أن تجمع حشرة **Plesispa reichei** يكون بالقرب من الأشجار المريضة ١٦ ضعف وجودها بالقرب من الأشجار السليمة، وكذلك فإن حشرة **Octodonta angulosa** توجد بالقرب من الأشجار المريضة ٨٢ ضعف وجودها بالقرب من الأشجار السليمة، مع ذلك فإنه لغاية سنة ١٩٩٤ لم تحدد أية حشرة تنقل الفيرويد أو إذا كانت الحشرات ذات دور فى نقل الفيرويد.

المدى العائلى:

يمكن أن يهاجم الفيرويد عدة أنواع من وحيدات الفلقة منها:ـ

1 - **Areca catechu**
2 - **Corypha elata**
3 - **Adonidia merrillii**
4 - **Elaeis guineensis**
5 - **Chrysalidocarpus lutescens**
6 - **Oreodoxa regia**

صفات فيرويدات كادانج ـ كادانج:

إن الشكلين من CCCVd التى ترافق مرض كادانج ـ كادانج تتواجد على شكل سريع fast يرمز له f وبطئ slow ويرمز له s. إن اكتشاف هذين النوعين لا يتأثر

بتخزين الورقة أو بطريقة إستخلاص الحمض النووى. إن الفحص الجهازى للأشجار المصابة أظهر أن حدوث هذه الأشكال يتأثر بطور تكشف المرض فى الأشجار. إن الأشكال السريعة من كل ccRNA - 1 و ccRNA - 2 تكون سائدة فى الأطوار الأولى من المرض، بينما الشكل البطئ هو الوحيد الموجود فى الأطوار المتأخرة من المرض. فى بعض الأشجار يحدث تحول من الشكل السريع إلى الشكل البطئ فى السعفات التى حدث فيها تقدم كبير للمرض. إن كل من ccRNA - 1 السريع والبطئ كلاهما دائرى وتختلف فى الوزن الجزيئى وفيهما تشابه كبيـر فى تتابع النيوكليتيـدات. إن اللقاح الذى يحوى الشكل السريع أكثر حيويـة من الذى يحوى الشكل البطئ. يقدر الوزن الجزيئى بواسطة الميكروسكـوب الالكترونى بحوالى ٠٠٠ ١٠٠ دالتون للسريع و ٠٠٠ ١٥٠ دالتون للبطئ. كمـا وأن ccRNA - 1 يوجد بكمية أكبر من ccRNA - 2.

إن مرض كادانج ـ كادانج يختلف عن بقية الأمراض الفيرويدية فى نقطتين أساسيتين، الأولى: وجود نوعين من RNA مرافقة للمرض، الثانية التنوع المختلف فى هذين النوعين ويسمى electrophoretic variation. إن الاختلاف الكبير فى الحركة الكهربائية فى الجيل والوزن الجزيئى فى كل من ccRNA - 1 السريع والبطئ يعود لطول الوقت الذى خضعت فيه الشجرة للإصابة.

عند تخزين الورقة على ٤°م على فترات لمدة ٩ أيام أو التجميد على فترات لمدة ٤ أيام قبل الاستخلاص بالطرق القياسية ليس له تأثير على الشكل فى ccRNA - 1. إن الهجرة الكهربائية سواء فى s أو f على درجة الحرارة العادية أو ٦٠°م فإن كل منهما يسير فى الحزمة الخاصة به وهذه تميز الأشكال الدائرية من ccRNA - 1.

إن الشكل ccRNA - 1 نوع f له محيط ١٠٧ نانوميتر أما نوع (s) فإن له محيط ١٢٣ نانوميتر وبالتالى فإن إختلاف التنوع فى الهجرة الكهربائية لا يعود للتركيب الثانوى أو لوجودهما على شكل دائرى أو مستقيم ولكن يرجع إلى إختلاف الوزن الجزيئى. فى جدول ٣٢ عزلات من ccRNA - 1 و ccRNA - 2 وبعض صفاتهما.

جدول ٣٢: صفات بعض عزلات ccRNAs.

عدد النيوكليتيدات + طول التتابع المتضاعف فى كل عزلة إن وجد								
نوع الفيرويد والعزلة	San Nasciso	Ligao 5	Ligao 1 T	Ligao 191D	Ligao 620 C	Ligao 14B	Tinambac	Baao 54
ccRNA - 1 - fast	—	—	٢٤٧ / ٢٤٦	٢٤٧ / ٢٤٦	٢٤٧ / ٢٤٦	٢٤٧ / ٢٤٦	٢٤٦	٢٤٦
ccRNA - 1 - slow	(٥٠) ٢٩٧	(٥٠) ٢٩٦	(٥٥) ٣٠١	(٥٠) ٢٩٦	(٥٠) ٢٩٦	(٥٠) ٢٩٦	—	(٤١) ٢٨٧
ccRNA - 2 - fast	—	—	٤٩٤ _ ٤٩٢	—	—	—	—	٤٩٢
ccRNA - 2 - slow	—	—	—	—	—	—	—	٥٧٤ (٤١)

ملاحظات: ـ

الرقم بين قوسين هو عدد النيوكليتيدات الإضافية على الطول الأصلى (التتابع المتضاعف).

الرقمين اللذين بينهما (/) يعنى أنهما خليط من عزلتين كل منهما لها عدد نيوكليتيدات الأول أو الثانى.

(—) تعنى لا توجد عزلة تابعة لهذا الفيرويد.

إن عزلة Baao 54 هى الممثلة لفيرويد كادانج ـ كادانج فى الأربعة أشكال ولكن هى المقصودة عندما يذكر فيرويد CCCVd وأحياناً يذكر اسم الفيرويد مختصر ويضاف أمامه رقم ٢٤٦.

إن الأشكال السريعة والبطيئة من ccRNA - 1 (٢٤٦ و ٢٨٧ نيوكليتيدة) والشكل السريع ccRNA - 2 (٢٩٢ نيوكليتيدة) كلها معدية. لم يكن هناك فرق معنوى بين حيوية الأشكال السريعة من ccRNA - 1 وccRNA - 2 وبين الأشكال المستقيمة والدائرية من ccRNA - 1. إن الشكل السريع من ccRNA - 1 هو بشكل معنوى أكثر الأشكال مقدرة على إحداث العدوى. إن القطعة الزائدة المكررة ٤١ نيوكليتيدة خفضت حيوية وكفاءة الإصابة فى ccRNA من ٦٨ ٪ إلى أقل من ٥ ٪. وبالتالى يمكن القول بأن جانب اليد اليمنى من الجزئ الأصلى للفيرويد تلعب دوراً معنوياً فى الحيوية. يوجد الشكل البطئ فى الأشجار المصابة فقط فى وقت ظهور الأعراض على الورقة. أما فى المراحل المبكرة من المرض فإن الشكل السريع فقط هو الذى يكون موجود، وبالتالى فإن هذا الشكل هو المسئول فى الطبيعة عن إنتشار المرض، وبالتالى فإن الأشكال البطيئة يكون لها دور أولى فى تكشف الأعراض، بينما الشكل السريع ccRNA - 1 - f يكون له الدور الأساسى

فى الحيوية وإنتشار المرض. إذن يمكن القول بأن الشكل السريع ccRNA - 1 - f هو الوحدة الأساسية المعدية لفيرويد كاداغ ـ كاداغ ويعتبر هو الممثل الوحيد لفيرويد كاداغ ـ كاداغ فى نخيل جوز الهند.

إن العزلة Baao 54 هى الممثلة للفيرويد ccRNA - 1 - fast وكذلك لـ ccRNA - 1 - s - وإن الشكلين لـ ccRNA - 1 فيهما كثير من القواعد المزدوجة داخل الجزئ وتستطيع أن تشكل شكل شبه عصوى مثل بقية الفيرويدات.

إن ccRNA - 1 - fast فيه ٢٤٦ نيوكليتيدة أما الشكل البطئ فيه ٢٨٧ نيوكليتيدة. إن الشكل البطئ ccRNA - 1 - s يحتوى جميع التتابع وتركيب أصغر الأشكال ccRNA - 1 - fast ولكن يختلف عنه بإضافة تتابع مزدوج وتركيب ٤١ نيوكليتيدة من رقم ١٠٣ إلى ١٤٣ وهذه القطعة مضافة على نهاية اليد اليمنى من الجزئ الطبيعى للفيرويد أما التتابع المزدوج فهو على موقع ١٢٣ و ١٢٤ من ccRNA - 1 - f.

أما تتابع النيوكليتيدات فى ccRNA - 2 - fast فهو يحتوى ٤٩٢ نيوكليتيدة أما الشكل البطئ يحتوى ٥٧٤ نيوكليتيدة وهما perfect dimers لأشكال ccRNA - 1 السريع والبطئ. إن كلاً من ccRNA - 1 - f و ccRNA - 1 - s تحتوى على مواقع للانشطار بواسطة أنزيم Ribonuclease T_1 على اليد اليمنى مشكلة عروة دبوس الشعر بين المواقع ١٢٤ و ١٢٥ فى ccRNA - 1 - f وبين الموقع ١٤٥ ـ ١٤٦ فى ccRNA - 1 - s. كما وأن ccRNA - 2 به مواقع للانشطار، عند حدوث هذا الانشطار يعطى جزئين من ccRNA - 1.

تنوعات ccRNA البطئ ووقت حدوث الإصابة:

فى المراحل الأولى من مرض كاداغ ـ كاداغ فإن الأشكال السريعة فقط من ccRNA - 1 و ccRNA - 2 تكون موجودة فى الأشجار المصابة وبعد حوالى ٢٤ ـ ٣٠ شهراً من ظهور الإصابة، فإن الأشكال البطيئة من ccRNA - 1 و ccRNA - 2 تبدأ فى الظهور وتزداد بتقدم المرض حتى تختفى الأشكال السريعة

وتسود الأشكال البطيئة. هذه البيانات مع ما سبق من إثبات أن الأشكال السريعة أكثر عدوى وحيوية من الأشكال البطيئة تتفق مع الانتاج الجديد من فيرويدات كادانج ـ كادانج. ويمكن تلخيص ما سبق فى النقاط الآتية:ـ

١ ـ الشكل البطئ من ccRNA - 1 يختلف عن الشكل السريع بوجود تتابع مفرد مكرر مغروز فى الجزئ ويمكن أن يتولد ببساطة من الشكل السريع بواسطة ميكانزم التجهيز أو النسخ.

٢ ـ عزلات الشكل البطئ من ccRNA - 1 تختلف فى الحجم وفى التتابع المتكرر المغروز وهذا يؤدى إلى القول بانعزال الأصل فى هذه التنوعات البطيئة.

٣ ـ بينما معظم العزلات السريعة تحتوى تتابع مختلف على نهاية ١٩٨ ويتكون من معدلات مختلفة من النوع ٢٤٦ و ٢٤٧ فإن كلاً من العزلات التسعة البطيئة تحتوى تجمع مفرد متجانس إما مع أو بدون نهاية C فى موقع متجانس لنهاية ١٩٨ فى الشكل ccRNA - 1 - f ومع حجم واحد من تتابع متكرر.

إن هذه المعلومات تتفق مع توليد ccRNA ذو الأشكال البطيئة من ccRNA ذو الأشكال السريعة عن طريق تتابع مفرد نادر يحدث مرتين فى فيرويد كادانج ـ كادانج، وبالتالى فإن جميع جزيئات ccRNA البطيئة نشأت من جزيئات آباء مفردة سريعة وتكون تجمعت فى شكل معين.

طرق عزل ودراسة فيرويد كادانج ـ كادانج

نظراً للطبيعة المختلفة لهذا الفيرويد وإختلافه عن بقية الفيرويدات فضلنا أن نذكر الطرقة العملية لدراسته.

مصدر المادة المعدية:

تستعمل أشجار جوز الهند المصابة طبيعياً بفيرويد كادانج ـ كادانج كمصدر للعدوى. تؤخذ سعفه رقم ٦ (ذات عمر ٥ ـ ٦ شهور) أو سعفه رقم ٢٠ (ذات

عمر ١٨ ـ ٢٠ شهر) حيث أنها تحتوى على أكبر تركيز من ccRNA، السعفه رقم ٦ تكون غنية بالفيرويد الشكل السريع والسعفه رقم ٢٠ تكون غنية بالفيرويد الشكل البطيء. يؤخذ حوالى ١كغم من الوريقات من كل سعفة. تنزع الوريقات عن الحامل ويزال العرق الوسطى منها ثم تفرم الوريقات إلى قطع مساحة كل منها ١ سم٢ ويستعمل سكين حاد.

استخلاص الأحماض النووية:

تستخلص الأحماض النووية من الأوراق وذلك بأن يؤخذ ٢٥٠ غرام من الأوراق المفرومة ثم تضرب فى خلاط مع ٧٥٠مللتر من محلول غير منتظم من ٠,١ مول سلفايت الصوديوم. يرشح المخلوط وينقى بواسطة آلة الطرد عن المركز سرعة ١٠٠٠٠ لفة لمدة عشرة دقائق. المواد الطافية من ٥ كغم أوراق تجمع ويضاف إليها Polyethylene glcol 6000 وذلك لترسيب الجزيئات الكبيرة Macromolecules. تجمع الكريات الصغيرة بواسطة آلة الطرد عن المركز وتستخلص مرتين بمادة SDS - phenol chlorophorm. ترسب الأحماض النووية من الطور المائى بإضافة ثلاثة أحجام من الايثانول. تجمع الكريات الصغيرة الناتجة بواسطة آلة الطرد عن المركز ويعاد استخلاصها بمادة SDS - phenol chloro-phorm. تجمع الأحماض النووية من الطور الثانى عن طريق الترسيب بالإيثانول. بعد ذلك يعاد تعليق الأحماض النووية فى ٠,١ مول أسيتيت الصوديوم ونصف حجم من ١٪ Cetyl trimethyl ammonium bromide يضاف لإعادة ترسيب الأحماض النووية. تجمع الكريات الصغيرة بالطرد عن المركز وتغسل أربعة مرات فى ٧٥٪ إيثانول محتوى ٠,١ مول أستيت الصوديوم. ثم بعد ذلك يعاد تعليق الكريات الصغيرة فى ٠,١ مول أستيت الصودويم وتستبعد الأحماض النووية آحادية الخيط بالمعاملة بمادة كلوريد الليثيوم. الباقى من الأحماض النووية (تشمل RNAs الفيرويدى) يعاد ترسيبها عن طريق إضافة ثلاثة أحجام من الإيثانول. الكريات

الأخيرة من الحمض النووى يعاد تعليقها فى ٠,٠١ أستيت صوديوم، ٥٪ سكروز وذلك للهجرة الكهربائية.

فصل الأحماض النووية:

تفصل ccRNAs عن الأحماض النووية فى النبات بواسطة ثلاثة دورات من PAGE وهى الاسم المختصر لـ Poly acry lamide gel electrophoresis باستعمال الجيل المائل. فى الدورة الأولى تهاجر جميع مستخلصات الحمض النووى من الأوراق تحت ظروف غير مدنترة فى سمك ٣ ملم من ٥٠٪ جيل فى منظم Trie - borate (TBE). بعد الصبغ بمادة Toluidine blue و gel slices تحتوى ال RNAs المطلوبة. تقطع كل شريحة وتفرد على سمك ٣ ملم من ٥٪ جيل محتوياً ٨ مول يوريا فى منظم TBE. تهاجر حزمة RNA فى الجيل الأصلى أثناء الهجرة الكهربائية. بعد الهجرة الكهربائية، فإن الأشكال المستقيمة والدائرية تحدد بالصبغ وتفحص شرائح الجيل المحتوية على هذه الأشكال. كل شريحة تفرد على سمك ٣ ملم ٣,٣٪ جيل فى منظم TBE. وبعد الهجرة الكهربائية فإن حزمة RNA تكتشف بالغسيل أو الإزالة من قاعدة الجيل باستعمال جهاز الفصل Bio - Rad preparative apparatus. يجمع ال RNA بالترسيب مع ثلاثة حجوم من الايثانول محتوية ٠,١ مول اسيتات الصوديوم.

حقن بادرات جوز الهند:

يستعمل جوز الهند **Cocous nucifera** L. Tambolilid. تجمع الجوزات التى ستستعمل كتقاوى من ١٠٠ شجرة عشوائياً، هذه الأشجار يجب أن تكون ذات عمر ٢٥ ـ ٣٠ سنة مفتوحة التلقيح. نفس الأشجار التى تؤخذ منها الجوزات تستعمل فى جميع التجارب اللاحقة. تحقن البادرات التى حصل عليها من الجوزات بمحقن ذو ضغط عال يسمى Panjet (معروف عالمياً خاصة فى لندن). التجربة الأولى تحقن البادرات ذات عمر ٣ شهور ثم تحفظ فى الظلام (شكل ٥٨) لمدة ٢٤ ساعة قبل الحقن بأربعة حقنات أخرى كل منها

١٠٠ ميكولتر فى قاعدة الانطلاقة الورقية الأولى ثم بعد ذلك تحفظ البادرات تحت الظل لمدة ٢ ـ ٣ أسابيع قبل نقلها إلى الحقل وتزرع على مسافات ٢م.

أما فى الطريقة الثانية (التجربة الثانية) فإن الجوزات التى تستعمل تقاوى تزال قشرتها جزئياً وحال بدء ظهور الريشة من القشرة وكذلك الجذور تحقن البادرات بالمحقن ويدخل ٢٥ ميكولتر لكل نمو. يستعمل أربعة جرعات تحقن فى قاعدة الريشة وأربعة جرعات للجذور. تحفظ البادرات المحقونة فى رمل رطب وفى الظل لمدة ٣ ـ ٤ أسابيع ثم تنقل وتزرع فى التربة فى أوعية بولى أثيلين وتحفظ فى الصوبا لمدة ٢ ـ ٣ شهور ثم تنقل إلى الأرض الدائمة.

إختبار البادرات المحقونة:

تجرى إختبارات التحليل للبادرات المحقونة لمعرفة وجود ccRNA المطلوب معرفته بعد ١ ـ ٢ سنة من الحقن وذلك بأخذ ١٠ غرام عينات من سعفات ذات عمر ٣ شهور ويجرى عليها عملية استخلاص الأحماض النووية وتقارن مع الإصابة الطبيعية. جدول ٣٣، ٣٤، ٣٥.

جدول ٣٣: يبين الانتاج المتوسط لفيرويد كادانج ـ كادانج النقى فى جوز الهند المتحصل عليه من الإصابة الطبيعية فى النبات.

نوع ccRNA	شكل RNA	إنتاج ccRNA ميكوغرام / كيلو غرام أوراق	
		متوسط	مدى
ccRNA - 1 - fast			
246 - 247 residues	دائرى	٦٨	٢٣ ـ ١٥٤
246 - 247 residues	مستقيم	٥	—
ccRNA - 1 - slow			
287 residues	دائرى	٧٧	٢٥ ـ ٢٨٠
301 residues	مستقيم	٨	٣ ـ ١٣
ccRNA - 2 - fast			
492 - 494	دائرى	٨	١ ـ ٢٥
ccRNA - 2 - slow			
574	مستقيم	٤	١ ـ ٥

جدول ٣٤ : حيوية الشكل السريع والبطئ لفيرويد كادانج - كادانج المنقى من أشجار مختلفة.

تركيز الشكل 1 ميكوغرام / ملتر	النسبة المئوية للبادرات المصابة بالحقن	
	شكل ١ سريع	شكل ١ بطئ
١٠٠	٥٠	صفر
٦٤	١٠	صفر
٢٥	١٠	صفر
١٠	٢٠	صفر
٥	٢٠	صفر
٠,١	١٠	صفر

تحقن عشرة بادرات كل مرة.



شكل رقم ٥٨ :
طريقة حقن بادرات جوز الهند بالحقنة Panjet الشكل العلوى A بادرات ذات عمر ٣ شهور. الشكل السفلى B بادرات حديثة الإنبات.

جدول ٣٥: مقارنة بين طريقتى الحقن (المذكورة فى طريقة العمل) الأولى والثانية فى البادرات ذات عمر ٣ شهور.

شكل ccRNA المستعمل فى الحقن	طريقة الحقن	
	الأولى	الثانية
ccRNA - 1 - f	٢/٥٠	٥/٣٤
ccRNA - 2 - f	١/٤٧	٣/٣٥
ccRNA - 1 - s	صفر/٥٠	٤/٢١
ccRNA - 1 - s + f	٢/٣٨	١٢/٢٣

ملاحظة:

الرقم يدل على عدد النباتات المصابة على عدد النباتات المحقونة.

ب ـ مرض تنانجاجا فى جوز الهند

Coconut Tinangaja Disease

كان أول ذكر لمرض تنانجاجا على أشجار نخيل جوز الهند **Cocos nucifera** سنة ١٩٧١ فى جزيرة Guam من جزر ماريانز فى المحيط الباسيفيكى. إقترح بعض العلماء أن مسبب هذا المرض مشترك مع مسبب مرض كادانج ـ كادانج على أشجار نخيل جوز الهند فى الفلبين حيث أن كلا المرضين يؤدى إلى تثبيط نمو وموت العائل قبل تمام النضج، ولكن مرض كادانج ـ كادانج قد نال قدراً كبيراً من الدراسة. الصفات المشتركة الأخرى لهذين المرضين تشمل بقع شاحبة على الأوراق، خفض كبير فى قمة الشجرة وانحطاط فى حيويتها، وتتأثر مدة البقاء للأشجار المصابة وتصبح ٢٥ سنة أو أكثر قليلاً (الوضع الطبيعى للأشجار تعيش ٦٠ سنة على الأقل). الاختلاف الوحيد الملاحظ فى الأعراض هو التأثير على إنتاج الجوزات، حيث أن مرض كادانج ـ كادانج يرافقه دائماً إنتاج جوزات أصغر أكثر استدارة (كروية) وتكون ذات خدوش أو تشققات أما مرض تنانجاجا إذا تقدم

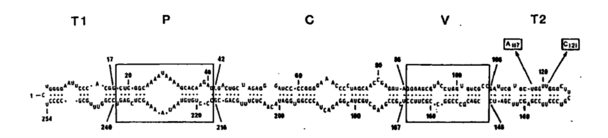
فى الأشجار فإنه يؤدى إلى ظهور جوزات صغيرة ذات قشور متطاولة محنطة بدون وجود نواة فيها.

وبالمثل كما فى مرض كادانج ـ كادانج فإن هذا المرض يتسبب عن فيرويد.

مسبب المرض:

يتسبب المرض عن فيرويد ويسمى فيرويد تنانجاجا Coconut Tinangaja Viroid ويكتب (CTiVd). لقد اكتشف الفيرويد فى تحضيرات الحمض النووى المأخوذة من أشجار نخيل جوز الهند المصابة بمرض تنانجاجا. مكونات RNA للفيرويد تشبه تلك الموجودة فى مرض كادانج ـ كادانج فى جوز الهند والذى يتسبب عن فيرويد CCCVd ولقد ذكر أن للفيرويد الجديد نفس صفة الهجرة فى الجيل تشابه تلك التى لأصغر شكل من أشكال CCCVd ذو أل ٢٤٦ نيوكليتيدة. زيادة على ذلك فإن تحضيرات الحمض النووى من الأشجار المصابة بالمرض تتهجن بكفاءة عالية مع (^3H) cDNA المجهزة للفيرويد CCCVd ذو أل ٢٤٦ نيوكليتيدة أكثر منه للحمض RNA للفيرويد CCCVd نفسه وبذلك إقترح بعض العلماء التسمية المشتركة لمسببى المرضين. إلا أن إختلاف الأعراض فى الجوزات أدى إلى جعل العلماء يتفقوا على أن هذا المرض يتسبب عن فيرويد غير فيرويد CCCVd الذى يصيب أشجار جوز الهند فى الفلبين.

إن أنواع RNA ذات الهجرة المتشابهة فى الجيل مع CCCVd - 246 نقيت من مستخلصات الحمض النووى وجهزت من أشجار جوز هند مصابة بمرض تنانجاجا ودرس التتابع بها بطريقة Direct RNA enzymic. فوجد أن ال RNA المنقى به ٢٥٤ نيوكليتيدة وأن هذا ال RNA مرافق دائماً لمرض تنانجاجا. أما التركيب الثانوى لهذا الحمض فهو مطابق لشكل التركيب الحلزونى والعصوى الشكل لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس. وجد أن لفيرويد CTiVd سلالتين مختلفتين فى ٢ نيوكليتيدة وقد لوحظت هاتين السلالتين فى العزلات المختلفة من الأشجار. وهناك مقارنة بين هذا الفيرويد وفيرويدات أخرى فى جدول رقم ٣٦. وإن الشكل الوصفى لهذا الفيرويد مذكور فى شكل ٥٩.



شكل رقم ٥٩ :

تتابع النيوكليتيدات المفترض فى التركيب الثانوى لعزلتين من فيرويد CTiVd، الاختلاف الوحيد بينهما هو وجود U محل A فى الموقع ١١٧، ووجود U محل C فى الموقع ١٢١.

إن فيرويد CTiVd متقارب جداً مع فيرويد CCCVd - 246 حيث أن فيهما نسبة تتابع متماثل تقارب ٦٤ ٪. إن التماثل الكبير وليس التماثل الكامل بين CTiVd و CCCVd يمكن أن يفسر إمكانية حدوث cross - hybridization بين كلا ال RNAs وكذلك الاختلاف فى تعبيرات الأعراض بين المرضين.

جدول ٣٦ : تماثل التتابع بين نطاقات فيرويد CTiVd وبعض الفيرويدات المماثلة.

مقارنة CTiVd مع الفيرويدات المذكورة	٪ تماثل تتابع فى نطاقات					
	T_1	P	C	V	T_2	الكلى
CCCVd - 246	٦٨	٥٠	٦٦	٧٥	٥٩	٦٤
PSTVd	٢٨	٣٦	٦٣	٢٨	٣٦	٤٣
HSVd	٦٠	٣٩	٤٧	٣٢	٤١	٤٠
CEVd	٣٨	٣٨	٦٧	٤٠	٣٨	٤٦

بجانب التماثل بين CCCVd و CTiVd فإن هذا الأخير يحتوى عدة مناطق ذات تتابع وتركيب متماثل مع PSTVd ومتطابق مع نموذج النطاقات المفترضة للفيرويدات. وجد أن نطاق T_1 يحتوى تتابع متكرر من CCUC وهذه المجموعة تتكرر إبتداءً من ١ ـ ٢٥١. أما نطاق T_2 فإنه يحوى تكرار CCUUC فى نيوكليتيدات من ١٣١ إلى ١٣٥. أما نطاق P فى فيرويد CTiVd فهو غنى بالبيورين Purine فى الشريط العلوى وهو بذلك مشابهاً للفيرويدات الأخرى شاملاً سيادة تتابع الأدنين والذى هو عال القابلية للإنشطار بواسطة RNase U_2 خلال تفاعلات التتابع. أما الخيط السفلى فيه سيادة تتابع الأدنين كما فى CCCVd. الخيط السفلى فيه نطاق P بالنسبة للفيرويدات الأخرى غنى فى تتابع اليوردين Uridine وهذا يعكس ولو جزئياً مقدرة هذا الفيرويد على مهاجمة عوائل وحيدة الفلقةmonocotyledonous كما فى CCCVd مقابل العوائل ثنائية الفلقة فى الفيرويدات الأخرى.

وبالمقابل ففى الفيرويدات الأخرى، فإن الجزء من جزئ الفيرويد الأكثر حفظاً بين CTiVd و CCCVd متوافق مع أكثر النطاقات تغيراً وهو نطاق V فى بقية الفيرويدات. إحدى الاحتمالات أن نطاق V فى CCCVd يحتوى تتابعات أساسية للمضاعفة الجزئية للتتابع المفترضة لتنشأ من جديد أثناء إصابة أشجار جوز الهند بواسطة CCCVd. إن حدود هذه التضاعفات تحدث فى نطاق V وفى وسط نهاية العروة فى نطاق T_2 من CCCVd. إن الفيرويد CTiVd الذى يهاجم أشجار جوز الهند يمكن أيضاً أن يؤدى إلى إعادة إتحاد مماثلة فى RNA. إن الأشكال الدائرية والمستقيمة لفيرويد CTiVd مشابهة لتلك الموجودة فى CCCVd، إلا أن RNA المستقيم يكون تركيزه منخفضاً ولكن مساوياً فى حجمه لإحدى تنوعات CCCVd مع نهاية أول ٥٠ نيوكليتيدة.

للفيرويد CTiVd عزلتان والفرق الوحيد بين العزلتين المأخوذتين من أشجار مختلفة من جوز الهند هو تغيرU مكان A فى الموقع ١١٧ وتغيرU إلىC فى نهاية النيوكليتيدة ١٢١، بهذه المواقع يمكن التمييز بين العزلتين.

٤ ـ فيرويدات الأقحوان

Chrysanthemum Viroids

أ ـ مرض تقزم الأقحوان

Chrysanthemum Stunt Disease

مقدمة :

يعتبر مرض تقزم الأقحوان من أوائل الأمراض الفيرويدية المكتشفة وله تاريخ فى تطور الأبحاث الفيرويدية يشبه تاريخ الأبحاث التى أجريت على مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس.

كان أول وصف لهذا المرض سنة ١٩٤٧ وذلك من قبل العالم Dimock ووصفه على أنه مرض معدى وذلك اعتماداً على تجارب النقل بالتطعيم. وفى سنة ١٩٤٩ ذكر العالم Olson أن العامل المسبب لهذا المرض ينتقل بواسطة حك الورقة بورقة أخرى مصابة، وهذا أكده علماء آخرون بحثوا فى هذا المرض منذ سنة ١٩٥٠ إلى سنة ١٩٥٣ . ولقد وجد أنه من بين ٧٦ نوع نباتى مزروع من العائلة المركبة، كان هناك ٣٩ نوعاً فقط قابل للإصابة بهذا المرض. من هذه الأصناف سبعة (خمسة أصناف Chrysanthemum وصنفان Senecio) يتكشف عليها أعراض مميزة واضحة جداً. حاول كثير من العلماء استعمال إختبار البقع الموضعية Local lesions فوجدوا أن هذا الإختبار لا ينطبق على الأعراض المرضية لهذه النباتات إلا أنه فى سنة ١٩٦٨ فإن العالم Lawson et al اكتشف بقع موضعية نشوية على أوراق النباتات المحقونة من نوع Senecio cruentus بعد حقنها بعامل التقزم ولكنه وجد أن هناك إختلاف فى عدد البقع بين الحوامل الزهرية وبين الأوراق فى نفس

النبات السابق قال إن إستعمال هذه البقع فى دراسة المسبب يعوق الكشف عن الكميات الصغيرة فى تركيز عامل التقزم. ونظراً لعدم وجود العائل الملائم للإختبارات الحيوية وتشخيص المرض تأخر الكشف عن، ومعرفة طبيعة مسبب المرض. ذكر بعض الباحثين سنة ١٩٥٢ أن عامل التقزم غير طبيعى فى ثباته للحرارة ولم يفقد حيويته حتى بعد غلى المستخلصات المأخوذة من النباتات المصابة، وذكر أيضاً أن حيوية الفيرويد تعود إليه ثانية فى المستخلصات المعاملة بالكحول.

حاول العالم Hollings ومساعدوه سنة ١٩٦٤ تنقية عامل التقزم عن طريق الترسيب بمادة كبريتات الأمونيوم ثم استعمال آلة الطرد عن المركز المجزئة ثم المعاملة بمذيبات عضوية. كذلك حضرت مستخلصات الفينول لتحديد فيما إذا كان العامل المسبب للمرض يمكن نقله بهذه المستخلصات أم لا. وذكر نفس العالم أنه ولا أى من هذه المستخلصات كان معدياً. مع أن هناك أجزاء صغيرة جداً مشابهةلتلك الموصوفة لفيرس الذبول المتبقع فى الطماطم وجدت فى النباتات المريضة ولكنها لم توجد فى النباتات السليمة، إلا أنه لم يتوفر الدليل بأن هذه الأجزاء معدية. وفى سنة ١٩٦٨ استطاع نفس العالم المذكور إجراء عملية استخلاص من النباتات المريضة باستعمال ٠,١ مول منظم فسفاتى ثم معاملة المستخلص بمادة Chloroform butanol وحصل على عائم شديد العدوى. أما المستخلصات المحضرة فى ٠,٠٢ مول منظم فسفاتى لم تكن معدية. كانت الحيوية والمقدرة على العدوى موجودة فى الحبيبات الداخلية من اللب المتجانس والمعاد استخلاصه فى خلاط والمعامل بمادة Chloroform butanol والمنقى باستعمال السرعة البطيئة لآلة الطرد عن المركز، أما الجزء العائم من المادة التى تم استخلاصها لم تكن معدية.

ذكر العالم Holling أن حيوية عامل التقزم فقدت فى مستخلصات خام مكونة من ٠,٠٠٥ مول منظم فسفاتى معامل بـ (RNase (3ug / m1 ولكن إذا كان المنظم ٠,٥ مول ونفس تركيز الأنزيم لا تفقد الحيوية.

استمرت الأبحاث فى هذا المجال حتى سنة ١٩٧١ حيث ذكر Lawson & Hearon أنه لا يوجد فيرس فى النباتات المتقزمة، عندئذ سارت الأبحاث فى هذا

المرض موازية للأبحاث على مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس وكذلك مرض اكسوكورتز الحمضيات. بعد أن تم إكتشاف أن مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس يتسبب عن فيرويد اتجهت الأبحاث عن فيرويد مسبب لمرض تقزم الأقحوان، وفعلاً ثبت أن هذا المرض يتسبب عن فيرويد وسمى فيرويد تقزم الأقحوان (CSVd) Chrysanthemum Stunt Viroid وذلك من قبل العالم Diener & Lawson سنة ١٩٧٣.

الأعراض:

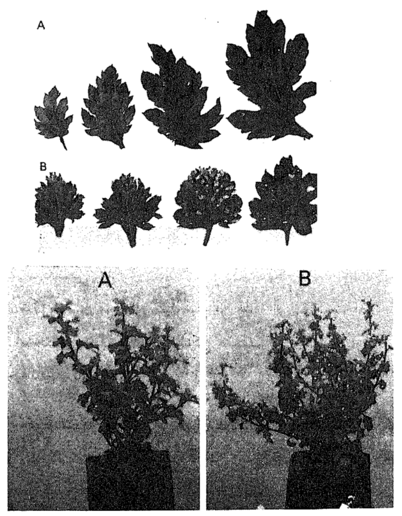
يوجد هذا المرض فى كل من الولايات المتحدة، كندا، Netherland، جنوب أفريقيا، ايطاليا والبرازيل. يسبب المرض خسائر تتراوح من نسبة بسيطة إلى نسبة عالية فى زراعات الأزهار وفى الأقحوان المزروع فى الحدائق وإذا لم تؤخذ الاحتياطات والمراقبة فيمكن أن يصل المرض إلى نسبة وبائية عالية.

تكون نباتات الأقحوان وازهارها أصغر من النباتات السليمة وأكثر شحوباً وذات نوعية أدنى بالمقارنة مع النباتات العادية، بعض الأزهار قد تظهر مائلة للون الأبيض (مبيضة). تتفتح الأزهار المريضة مبكراً عن الأزهار العادية بمدة ٧ ـ ١٠ أيام. غالباً ما تنمو البراعم الجانبية قبل الأوان وتنتج أعداداً كبيرة من الفروع والمدادات (شكل ٦٠). يظهر على بعض الأصناف ندباً بيضاء أو يظهر تلطخات صفراء على الأوراق. تكون العقل المأخوذة من النباتات المصابة ضعيفة التجذير وتظهر النباتات المصابة تغيرات فى الميتابولزم وفى بدايات الكامبيوم. غالباً ما تتقزم النباتات بعد إبتداء الإصابة بحوالى شهر أو أكثر وإن هذه الصفة (التقزم) تكون السائدة لغاية موت النبات ولذا سمى المرض باسم مرض تقزم الأقحوان.

الكائن الممرض:

يتسبب هذا المرض عن فيرويد تقزم الأقحوان Chrysanthemum stunt (CSVd) Viroid يتكون من ٣٥٤ ـ ٣٥٦ نيوكليتيدة وذلك حسب العزلات. ينتقل هذا الفيرويد عن طريق العصارة. نقطة التخفيف القصوى للفيرويد حوالى ١ : ١٠٠٠٠، درجة الحرارة المميتة ٩٦ ـ ١٠٠°م لمدة عشرة دقائق. يحتفظ الفيرويد بمقدرته على إحداث إصابة لمدة شهرين فى العصارة ولمدة سنتين فى

الأوراق الجافة. ينتشر الفيرويد بسهولة فى العصارة المحمولة على الأصابع أو على السكاكين أو الأدوات الزراعية المستعملة أثناء العمليات الزراعية مثل التقليم، تشذيب النباتات، أخذ العقل، قطف الأزهار. لا ينتقل الفيرويد بالحشرات أو نواقل أخرى.



شكل رقم ٦٠ :
أعراض الإصابة بفيرويد تقزم الأقحوان على نبات الأقحوان.
العلوى: A: أعراض الأصابة بالفيرويد CSVd على أوراق الأقحوان مراحل مبكرة.
B: أعراض الإصابة بالفيرويد CSVd على أوراق الأقحوان مراحل متأخرة.
السفلى: A: نبات الأقحوان سليم. B: نبات الأقحوان مصاب بالفيرويد ويظهر عليه أعراض كثرة الفروع والتقزم.

يتحرك الفيرويد ببطء خلال النبات وغالباً ما يحتاج إلى ٥ ـ ٦ أسابيع ليتحرك خارج الورقة المحقونة ويصل الساق. تتشكف الأعراض الجديدة بعد ٣ ـ ٤ شهور من الإصابة. يبقى الفيرويد حياً أساساً في النباتات المصابة التي يبدو أنها معمرة وتحمله إلى الموسم القادم. يمكن أن تتلوث النباتات أيضاً بالفيرويد من أجزاء النباتات الميتة.

يصيب الفيرويد كل من الأقحوان والطماطم ونبات **Gynura**.

كما في بقية الفيرويدات فإن هذا الفيرويد له شكلان الأول دائرى والثانى مستقيم وإن هذين الشكلين قد إختبرا لمعرفة حيويتهما على نبات **G. aurantiaca** وإن جدول رقم ٣٧ يبين أن كلا الشكلين لهما كفاءة متساوية في الإصابة، وهذا ما يؤدى إلى القول بالغاء ما كان يعرف بأن كفاءة الشكل المستقيم كانت ناجمة عن إختلاط الشكل الدائرى مع الشكل المستقيم. أمكن استخلاص ٢٠٠ ميكوغرام شكل دائرى من كل كيلوغرام من المادة النباتية الحية المصابة بالفيرويد وكذلك استخلاص ٣٥ ميكوغرام شكل مستقيم من كل كيلوغرام من المادة النباتية الحية المصابة بالفيرويد.

عند فحص مستحضرات نقية من فيرويد CSVd بالميكروسكوب الالكترونى فإن الجزيئات الدائرية المدنترة تشاهد مع بعض الجزيئات المستقيمة. تكون بعض الجزيئات المستقيمة أكثر سمكاً من الجزيئات الدائرية. الجزيئات الأطول والأقل سمكاً هي الأشكال المدنترة للشكل المستقيم المشكل بواسطة عملية ال **nicking** للجزيئات الدائرية خلال ١٥ ـ ٢٠ ثانية من التحضين في ٩٨٪ **Formamide** على درجة ٦٠°م التي هي ضرورية للتفريد. أما بالنسبة للأشكال المستقيمة من الفيرويد فهي الأسرع هجرة في الجيل.

جدول ٣٧: نتائج إختبارات الشكل الدائرى والمستقيم من فيرويد تقزم الأقحوان على نبات G. aurantiaca.

شكل الفيرويد المختبر	تركيز الفيرويد المختبر (ميكوغرام / مل) حيوية الإصابة به ٪						
	٥	١	٠,٥	٠,١	٠,٠٥	٠,٠١	٠,٠٠٥
شكل دائرى	٪١٠٠	—	٪١٠٠	—	٪٧٥	—	٪١٧,٨
شكل مستقيم	٪١٠٠	—	٪١٠٠	—	٪٨٢	—	—
شكل دائرى	—	٪٧٥	—	٪٦٠	—	٪١٧,٨	—
شكل مستقيم	—	٪١٠٠	—	٪٥٠	—	٪١٨	—

الأعراض التشريحية:

لدراسة الأعراض التشريحية لفيرويد تقزم الأقحوان، يستعمل أنواع من نبات الأقحوان حساسة للفيرويد وتكون كاشفة له بحيث أن أعراض الإصابة الفيرويدية تكون نموذجية على هذا النبات. ومن أهم الأصناف التى تعتبر كاشفة لهذا الفيرويد هو الصنف Bonnie Jean.

تجرى الدراسة التشريحية على نبات الأقحوان المصاب بالفيرويد بعد ظهور الأعراض عليه، إن التعبيرات المرضية بالأعراض تحدث بعد أربعة أسابيع من الحقن عندما تبدأ النباتات المحقونة بالفيرويد CSVd فى إظهار إنحناء شديد فى الساق. خلال الفترة من ٤ ـ ١٠ أسابيع بعد الحقن فإن النباتات غالباً ما تتقزم ويظهر تبقع وتبرقش على الأوراق العلوية وأخيراً على الأوراق السفلية. لا يلاحظ سلوك متناسق من الأعراض يتبع ذلك.

عندما يؤخذ جزء القمة المرستيمية من النباتات المحقونة بالفيرويد ويقارن شكلها غير الطبيعى مع تلك المأخوذة من النباتات غير المحقونة، يلاحظ بالمقارنة أن القمم المرستيمية فى النباتات المحقونة تكون ملتوية ومتقزمة وأحياناً مشوهة. يمكن اكتشاف الفيرويد CSVd بواسطة الهجرة الكهربائية فى الجيل بعد ٣ أسابيع من الحقن فى

جميع النباتات المحقونة أما النباتات غير المحقونة فلا يلاحظ الفيرويد فى مستخلصاتها.

لكى ندرس الأعراض التشريحية فى النباتات المصابة بالمرض يجب أن نقارن بين الصفات التشريحية للنباتات السليمة والمصابة. لذا يجب أن نذكر الآن الصفات التشريحية للنباتات السليمة ثم التغيرات التشريحية فى النباتات المصابة ونقارن بينهما.

تشريح النباتات غير المريضة:

عند عمل مقاطع طولية وعرضية فى الساق وفحصها لتحديد الوضع التشريحى لساق نبات الأقحوان صنف Bonnie Jean فإن تشريح الساق يشبه ما ذكره كل من Delaware وMandalay. المقاطع العرضية فى أنسجة العرق الوسطى للورقة فى مناطق القمة النامية والقاعدة أظهرت أن البشرة العلوية والسفلية كل منهما يتكون من طبقة مفردة من الخلايا. تكون الخلايا البرانشيمية السياجية Palisade متطاولة إلى مثلثة الشكل منضغطة فى ترتيبها. أما الميزوفيل الإسفنجى يكون فيه فراغات بين الخلايا ويتكون من خلايا غير منتظمة الشكل. أما الحزم الوعائية فتتكون من غلاف الحزمة، اللحاء، الكامبيوم الوعائى والخشب.

عند فحص سلسلة مقاطع طولية من مرستيم خضرى وآخر تكاثرى فإن المقاطع الوسطى من المرستيم التكاثرى تتكون من واحدة أو إثنتين من الطبقات الرقيقة وصف من الخلايا مكونة مرستيم العرق ومنطقة جانبية على كلا طرفى منطقة النسيج المتوسط. يختلف تشريح المرستيم التكاثرى عن المرسيتم الخضرى فى عرض وإتساع القمة والذى من هذه المنطقة تنشأ مكونات الزهرة.

تشريح النباتات المحقونة بالفيرويد CSVd :

١ - الساق:

التغيرات التشريحية فى النباتات المصابة بالفيرويد CSVd تظهر بعد أربعة أسابيع من الحقن ولكن تكون أكثر وضوحاً فى العينات المأخوذة للفحص بعد ٧ أسابيع

من الحقن. تحدث أكثر التغيرات وضوحاً فى الجزء العلوى من النبات. يكون الكامبيوم الوعائى أكثر وأول الأنسجة المتأثرة ويبدو أن التغيرات فى الكامبيوم هى المسئولة عن التغيرات اللاحقة فى الأنسجة الأخرى. أما التغيرات التشريحية فى الخشب واللحاء والقشرة لا تكون شديدة مثل تلك الملاحظة فى الكامبيوم الوعائى. يلاحظ فى الجزء السفلى من النبات أحياناً خلايا متضخمة بين خلايا الألياف سميكة الجدار من غطاء الحزمة الوعائية، هذه الخلايا المتضخمة غالباً ما تكون خلايا ذات جدر مميزة بوضوح والأنوية فيها لا تكون دائماً واضحة أو مرئية.

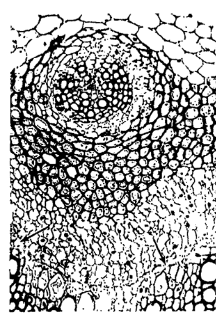
فى الجزء العلوى من النبات، فإن خلايا الكامبيوم فى الحزم الوعائية تظهر مشوهة ومن الصعب تمييزها عن خلايا اللحاء والخشب المجاورة لها. فى مناطق أخرى تظهر الخلايا فى الكامبيوم الوعائى كأنها مطحونة (شكل ٦١). الاختلال الوظيفى للكامبيوم الوعائى يكون واضح فى الحزم الوعائية فى النسيج المصاب، والبدايات الكمبيومية كثيراً ما تكون غير واضحة وتفتقر إلى الجدر الخلوية المميزة (شكل ٦٢). يحدث تحطيم للبدايات الكومبيومية بالإضافة إلى التميز غير الكامل فى البدايات الكمبيومية. وهذا يؤدى إلى تكوين نسيج يتكون من خلايا ذات جدر رقيقة تكون غالباً مستطيلة الشكل متعامدة فى صفوف. خلايا برانشيما الخشب غالباً ما تكون سهلة الصبغ ومتضخمة.

النباتات المصابة والتى تظهر أعراض خارجية بكثرة على جانب واحد من النبات، غالباً ما تظهر تغيرات تشريحية شديدة فى نفس الجانب من النبات. فى هذه المناطق يكون النسيج الوعائى قد أحتل بواسطة خلايا متضخمة، والأنوية فى هذه الخلايا متطاولة وقابلة للصبغ. يتجمع البكتين فى جيوب فى مركز النسيج المتضخم والذى ازداد عدده الموجود فى الأجزاء القمية فى الساق وبقايا النسيج الوعائى يلاحظ فى مركز هذه الجيوب.

فى المقطع الطولى فإن الكامبيوم الوعائى عادة يتكون من بدايات شاذة ولكن أيضاً تتميز بتكشف خلايا متضخمة. فى كثير من المقاطع فإن نسيج اللحاء يكون قابل للصبغ والإختبارات الهستوكيماوية للكالوس تكون موجبة. تظهر المقاطع

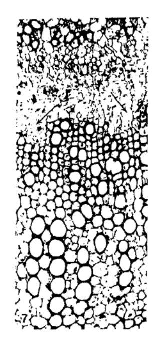
الطولية فى الأنسجة تغيرات تشريحية أقل شدة وتتكون من جيوب ذات مواد داكنة اللون (الصبغة) والتى تعطى إختبار موجب للبكتين. يظهر فى المقاطع الطولية أيضاً خلايا متضخمة من الخلايا البرانشيمية للخشب. هناك تغيرات تشريحية أخرى تشمل مناطق من خلايا متضخمة ومواد داخل الخلايا ذات لون داكن فى القشرة شكل ٦٣. المواد ذات الصبغة الداكنة تعطى نتيجة موجبة لإختبار الصمغ الجرحى وفى بعض الحالات تعطى إختبار موجب للبكتين مستعملة إختبارات Orcinol و Iron absorption. تكون طبقة الابديرم احادية الخلية قد استبدلت فى بعض الأحيان بطبقة عديدة الخلايا أو غالباً بواسطة فجوات محتوية Wound gum وبكتين. التكاثر الخلوى لهذا النوع يكون واضحاً فى المقاطع الطولية.

فى بعض المقاطع يكون هناك كتلة من الخلايا مشابهة فى مظهرها تلك التى فى نسيج القمة المرستيمية تحل محل مكونات النسيج الوعائى. هذه المناطق غالباً ما تتصف بوجود خلايا ذات صبغة داكنة تحتوى أنوية كبيرة واضحة وتمتد خلال النسيج الوعائى فى القشرة.



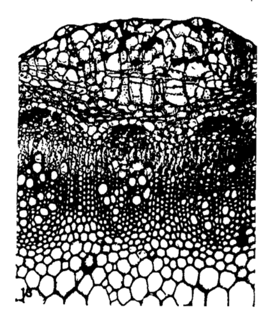
شكل رقم ٦١:

مقطع يظهر التميز غير الكامل فى بدايات الكامبيوم وتحطيم وتكسر الخلايا فى الكامبيوم الوعائى فى ساق نبات الأقحوان المصاب بفيرويد CSVd (يلاحظ الأسهم). التكبير ٢٦٥ مرة.



شكل رقم ٦٢ :

مقطع يظهر الفجوات فى الكامبيوم الوعائى فى ساق نبات الأقحوان المصاب بفيرويد CSVd يلاحظ الأسهم. التكبير ٢٨٠ مرة.



شكل رقم ٦٣ :

مقطع عرضى فى ساق نبات الأقحوان المصاب بفيرويد CSVd يظهر تضخم الخلايا وزيادة عددها فى القشرة والمواد ذات الصبغة الداكنة. التكبير ١٦ مرة.

٢ ـ القمة المرستيمية :

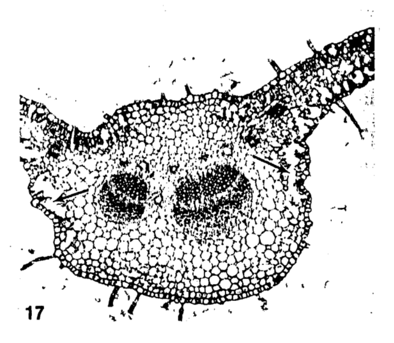
أكثر الاستجابات شيوعاً فى العائل عند الإصابة الفيرويدية تلاحظ فى المرستيمات الخضرية حيث تتكون فجوات عمودية تمتد خلال مرستيم العرق الوسطى والقمة. إن عدد وحجم هذه الفجوات يختلف من مرستيم إلى مرستيم. أما فى المرستيم التكاثرى فإن استجابة العائل للإصابة تكون كما ذكر فى المرستيم الخضرى وتلاحظ الفجوات بشكل عام. الخلايا فى نسيج المرستيمات التكاثرية من النباتات المصابة غالباً ما تكون أقل تماسكاً فى ترتيبها من ذلك الملاحظ فى النباتات غير المحقونة.

٣ ـ الأوراق:

التغيرات التشريحية فى الأوراق الحديثة ذات البثرات المصفرة تشمل تحطيم خلايا الميزوفيل شكل ٦٤ . وإن الفجوات المتكونة غالباً ما تكون مرتبطة مع الجانب البعيد عن المحور مباشرة فى الجهة الداخلية للبشرة الخارجية السفلى. فى بعض مناطق صفحة الورقة يكون الابيدرمز السفلى منفصلاً عن بقية النسيج بواسطة هذه الفجوات، بينما فى مناطق أخرى فإن خلايا الميزوفيل المتطاولة تعمل جسر أو كوبرى يصل هذه الفجوات من الميزوفيل الاسفنجى إلى الابيدرمز السفلى. فى بعض المقاطع فإن خلايا الميزوفيل السياجية تكون أقل تلاحماً فى ترتيبها منها فى الأوراق من النباتات غير المصابة بالفيرويد.

أما فى الأوراق التى التحمت فيها البقع الصفراء فإن خلايا الميزوفيل النسيجية تكون غير منتظمة الشكل والحجم وفى بعضها تكون الخلايا متطاولة شكل ٦٥ . تكون طبقات الابديرمز دائماً غير واضحة فى الأوراق المظهرة أعراض شديدة. فى بعض المقاطع يكون هناك خلايا ميزوفيل مفردة متحطمة وتكون البلاستيدات الخضراء والأنوية أقل وضوحاً فى هذه الأنسجة منه فى خلايا الميزوفيل فى نسيج ورقة من نباتات غير محقونة. البلاستيدات الخضراء والأنوية تكون غير مميزة فى خلايا الميزوفيل فى النباتات المصابة.

يمكن القول بأن التغيرات التشريحية تدل على أنه يمكن أن يكون هناك فرق مميز بين التغيرات التشريحية الأولية والثانوية، التغيرات التشريحية التي تحدث في الأنسجة المرستيمية والكامبيوم الوعائي ومرستيم الفروع يمكن اعتبارها تغيرات أولية. أما التغيرات التي تلاحظ في الأنسجة الأخرى يمكن اعتبارها تغيرات ثانوية. إن ظهور الأنوية المتضخمة وتمزق النسيج المرستيمي يؤدي إلى القول بأن هذا تعبيرعن النشاط المباشر للفيرويد من حيث بناء ال RNA أو تضاعفه في نواة خلية العائل. هذه التغيرات يمكن أن تكون ناتجة من عوامل أخرى مثل عدم التوازن الهرموني وتسمى تأثيرات ثانوية. يمكن القول بأن التغيرات المحدثة في نباتات الأقحوان المصابة بالفيرويد تكون مشابهة لتلك المتسببة عن الإصابة بالفيروسات المختلفة في العائل النباتي.



شكل رقم ٦٤ :

مقطع عرضي في نصل الورقة من نبات أقحوان مصاب بفيرويد CSVd يظهر تحطم نسيج الميزوفيل على الجانب القمي من الليمينا. يلاحظ الأسهم. التكبير ١١ مرة.



شكل رقم ٦٥ :
مقطع عرضى فى نصل الورقة من نبات أقحوان مصاب بفيرويد CSVd يبين استطالة الخلايا السياجية. وتحطيم طبقات الابيدير. التكبير ٥٧ مرة.

استعمال فيرويد CSVd فى تقليل الإصابة ببكتريا العفن الطرى:

يعتبر مرض تقزم الأقحوان الفيرويدى والإصابة البكتيرية (العفن الطرى) من الأمراض الهامة التى تصيب الأقحوان وتؤثر على إنتاج الأزهار فى النوع **Chrysanthemum morifolium** وإن معظم الدول تمنع فى الحجر الزراعى دخول الأجزاء النباتية من الأقحوان إذا كانت تحمل بكتيريا **Erwinia Chrysanthemi** وكذلك إذا كانت تحمل فيرويد تقزم الأقحوان CSVd.

إن بكتيريا **E. chrysanthemi** هى بكتيريا العفن الطرى القادرة على إفراز أنزيمات بكتينية (محللة للبكتين) وتسبب تحطيم البرانشيما الوعائية وتحلل النخاع. لقد وجد أن إنخفاض التفكك فى النخاع الناتج من الإصابة البكتيرية فى عقل الأقحوان المصابة بالفيرويد CSVd له علاقة بوجود الفيرويد نفسه فى النبات.

لدراسة تأثير الإصابة الفيرويدية على تحلل النخاع فى عقل الأقحوان صنف Bonnie Jean بواسطة بكتيريا العفن الطرى E. chrysanthemi سلالة ١٥٨ . تؤخذ عقل من النباتات ذات عمر ٣ أسابيع والتى نشأت من أصول نباتات إما سليمة أو مصابة بالفيرويد CSVd ولكنها مصابة بالبكتيريا ويلاحظ أعراض الإصابة البكتيرية عليها وذلك بأن يظهر على النخاع عفن أحمر داكن طرى بالإضافة لتلون الحزم الوعائية فوق النقطة حيث ينتهى عفن النخاع. لا يظهر أعراض على أنسجة الساق الخارجية.

تبين من الدراسة أن العفن الطرى الذى حدث فى السيقان المصابة بالفيرويد CSVd كان تقريباً ثلث الكمية التى تحدث فى النباتات غير المصابة بالفيرويد. وجد فى إحدى التجارب أن طول النخاع المتحلل (بواسطة البكتيريا) فى النباتات غير المصابة بالفيرويد ١٧,٨ملم فى حين كان طوله فى النباتات المصابة بالفيرويد ٥,٨ ملم وفى تجربة أخرى كان طول النخاع المتحلل فى النباتات غير المصابة بالفيرويد ٢٢,٦ ملم فى حين أنه كان فى النباتات المصابة بالفيرويد ٧ملم.

العلاقة بين الفيرويد الموجود فى النبات وخفض تحلل النخاع بالبكتيريا:

بعد عشرة أيام من زراعة ٢٠ نبات سليم فى أوعية، يغرز فى هذه النباتات أقراص نسيجية (تحقن) إما من أصول سليمة أو من أصول نباتية مصابة بالفيرويد. كان يتم الحقن على بعد ٣٥ ملم تحت قمة الفرع الطرفية. تحفظ جميع النباتات على درجة حرارة ٢٩ ـ ٣٠°م وطول نهار ١٦ ساعة. تزال الأفرع الطرفية بعد عشرة أيام من الحقن وهذا يؤدى إلى تكوين أفرع جانبية. بعد ١٠، ٢٠، ٢٦، ٣٤ و٤١ يوم بعد الحقن يؤخذ فرع قمى واحد أو جانبى من كل نبات من فوق منطقة الحقن. يؤخذ ٢ غرام من نسيج نصل الورقة ويستعمل للكشف عن الفيرويد. فهرسة النباتات السليمة على ١٠، ٢٠ و٤١ يوم فقط. يؤخذ قطع من الساق بطول ٥ ملم من قاعدة كل عقلة وتوضع فى مثبت للدراسة الهستولوجية.

الجزء الباقى من الفرع (الساق + أعناق الأوراق) يقطع على بعد ٤٠ ملم تحت القمة وتحقن بالغمر (بالبكتيريا) لإختبار التفكك البكتيرى.

تبدأ النباتات المحقونة بالفيرويد تظهر الأعراض بعد ٢٧ يوم من الحقن، أما حدوث الأعراض واكتشاف الفيرويد يتم بعد ٣٤ و ٤١ يوم بعد الحقن كما هو واضح فى جدول ٣٨ وتبين أن تفكيك النخاع البكتيرى قد خفض معنوياً فى حالتين إما باكتشاف CSVd فى نسيج الورقة بطريقة PAGE أو بالتعبيرات العرضية للمرض الواضحة للفيرويد. وبشكل عام فإن هناك خفض قليل فى تفكك النخاع قد حصل عليه فى العقل المأخوذة من نباتات محقونة بالفيرويد، ولكن الخفض يكون أكثر إذا كانت العقل مظهرة أعراض الإصابة الفيرويدية وتحتوى على كمية يمكن تقديرها من الفيرويد (تكاثر فيها الفيرويد بكمية كبيرة). الأعراض المرئية (بقع صفراء) تظهر إما لفترة قصيرة قبل أو فى نفس الوقت الذى يكون فيه عيار الفيرويد المكتشف بواسطة إختبار PAGE كاف لأن يسبب ظهور الأعراض.

جدول ٣٨ : العلاقة بين تعبيرات الأعراض واكتشاف الفيرويد CSVd ، ٣٤ و ٤١ يوم بعد حقن الأقحوان بالفيرويد.

بعد ٣٤ يوم من الحقن		بعد ٤١ يوم من الحقن	
أعراض الورقة	اكتشاف الفيرويد	أعراض الورقة	اكتشاف الفيرويد
صفر	—	صفر	—
صفر	—	١	—
صفر	—	١	—
صفر	—	١	—
صفر	—	٢	+
صفر	—	٢	+
١	+	٣	+
٢	+	٣	+
٢	+	٣	+
٣	+	٣	+

ملاحظات:

صفر = لا يوجد أعراض، ١ = قليل من البقع على ورقة أو ورقتين، ٢ = بقع على عدة أوراق، ٣ = كثير من البقع على كل الأوراق، + = يمكن اكتشاف الفيرويد، — = فيرويد غير مكتشف.

إعادة اكتشاف البكتيريا من العقل المحقونة:

أمكن عزل البكتيريا E. Chrysanthemi سلالة ١٥٩ المحقونة فى العقل النباتية باستمرار من المقطع الأول والثالث (كل مقطع يبعد ٨ ملم عن المقطع الآخر وذلك إبتداءً من القاعدة) من العقل غير المصابة بالفيرويد والمحقونة أيضاً بالفيرويد CSVd. لم يمكن عزل البكتيريا من المقطع الخامس. هذه النتيجة تدل على أن البكتيريا الموضوعة على القاعدة فى العقل السليمة والمحقونة بالفيرويد تتحرك لنفس المسافة العمودية تقريباً وتكون ذات مقدرة على البقاء حية على الأقل خمسة أيام ضمن العقل.

الإختبارات الهستولوجية:

لم يلاحظ إختلافات تشريحية بين السيقان السليمة والمحقونة بالفيرويد وقت الحقن. إن تشريح سيقان حديثة نموذجية من الأقحوان صنف Bonnie Jean، لوحظ فى المقاطع العرضية أنها تختلف قليلاً فقط عن الصنف Giant 4 وهو النموذج الأمثل للتشريح. فى سيقان Bonnie Jean يبدأ النخاع فى قاعدة الحزم الوعائية بقليل أو بدون ألياف extraxylary تفصل بين النخاع وقاعدة الحزم الوعائية. المقاطع فى السيقان المتقدمة بالسن تظهر أغطية للحزمة فى الألياف الناضجة، مناطق كبيرة فى النسيج الوعائى Interfasicular وكثير من الألياف Extraxylary.

فى سيقان العقل السليمة يبدو أن البكتيريا تتحرك إلى أعلى فى النخاع وتفكك النسيج. كذلك فإن البكتيريا تتحرك ضمن عناصر الأوعية الخشبية، حيث أنها وجدت ضمن الأوعية فوق المنطقة المتكشف فيها تعفن النخاع. تحطيم الأوعية تسبب بواسطة البكتيريا عن طريق تحطيم الأوعية الداعمة لنسيج برانشيما الخشب ثم تنتشر من الحزم الوعائية وتفكك النخاع القريب من الخلايا. يكون تفكك الحزم الوعائية والنخاع شديداً بعد خمسة أيام من الحقن بينما الأنسجة الأخرى تظهر غير متأثرة.

وعلى النقيض من ذلك فإن البكتيريا فى العقل المصابة بالفيرويد تبقى محددة بشدة مع العناصر الوعائية والتى تكون على شكل مستعمرات أولية وتسبب كمية قليلة من تحلل النخاع فى قاعدة العقلة ولكنها لا تستمر فى الحركة إلى القمة البعيدة. لوحظت البكتيريا ضمن تجاويف العناصر الوعائية، ولكن قليل من الخلايا من برانشيما الخشب، الكامبيوم، اللحاء أو النخاع تحطمت بعد خمسة أيام. الإختبارات الهستولوجية أظهرت عدم وجود إختلافات كبيرة بين مقاطع الساق المصابة والخالية من الفيرويد CSVd.

هل هذه الظاهرة وقاية بالتضاد؟؟

إن هذه الظاهرة تختلف عن ظاهرة الوقاية بالتضاد Cross - Protection، حيث أنه فى الأخيرة يكون الكائنين الداخلين فى التجربة ذوى علاقة قريبة من بعضهما البعض مثل سلالات لفيرس أو فيرويد معين، ولم يسبق أن استعمل فيرويد فى مقاومة أو تخفيض أعراض متسببة عن كائنات أخرى، فى حين أن الفيروسات استعلمت فى تخفيض أو زيادة شدة الإصابة بالفطريات.

فى هذه التجربة فإن بكتيريا **E. Chrysanthemi** سلالة ١٥٩، بكتيريا العفن الطرى تمتلك أنزيمات بكتينية والتى يمكن أن تحطم الصفيحة الوسطىMiddle lamellae فى الخلايا الربانشيمية مؤدية إلى موت الخلية وفقد إنتفاخ النسيج وبالتالى فإن هذه الأنزيمات تؤثر على الأنسجة العصارية فى الأقحوان (النخاع والبرانشيما الوعائية)، بينما الجدر ذات اللجننة العالية تكون أكثر مقاومة للبكتيريا. عندما تفقد الأنسجة عصاريتها وتتشقق أنسجة الساق فإن استعمالها يكون صعب من قبل البكتيريا وبالتالى يمكن أن نتوقع تكاثر الفيرويد وتحركه خلال النباتات المحقونة الناتجة من فقد صفة العصارية، وبالتالى فإن هذا التكاثر يمكن أن يكون كافياً لمنع أو خفض الأنزيمات البكتيرية المحطمة والتى عادة تؤدى إلى العفن الطرى.

لوحظ فى المقاطع المثبتة والمأخوذة من الساق بعد ٨٤ يوم من الحقـن بالفيرويد CSVd أنها أظهرت كثيراً من Extraxylary fibers وقلنسوة ناضجة للحزمة الوعائية

بالإضافة لزيادة سمك الجدر الخلوية. وعلى أية حال فإن الاختلافات فى التشريح العام والذى يمكن أن يحسب لصالح الخفض فى كفاءة البكتيريا لا يبدو واضحاً فى تجارب مقاطع الساق السليمة والمحقونة بالفيرويد. إن التغيرات الكبيرة فى تركيب الساق والتى تحد من الإصابة لا تظهر مبكراً بوقت كاف ليكون متزامناً مع العلاق بالفيرويد المتكشف وتخفيض تفكك النخاع. إذا كان الفقد فى عصارية السيقان المصابة بالفيرويد CSVd داخلاً فى هذا الموضوع، فمن الصعب تحديد العامل أو العوامل المسئولة عن الخفض فى التفكك. بينما الفرصة لاكتشاف الفقد أو الحصول على كميات صغيرة من مكونات الجدار يمكن أن تكون قليلة، هذه التغيرات يمكن أن تؤثر كثيراً على مقدرة التفكك للبكتيريا.

إن نتائج الدراسات الهستولوجية للمقاطع المصابة بالبكتيريا، يبدو أنها تدل على أن ارتباط أو تجمع البكتيريا فى النباتات المصابة بالفيرويد فى عناصر الأوعية الخشبية وإن فشل البكتيريا فى تمزيق العناصر الوعائية بانطلاقها المتتابع فى خلايا النخاع يؤدى إلى القول بأن هناك تغير فى تركيب الوعاء. لقد ذكر بعض الباحثين أن بعض نباتات الأقحوان تنتج مادة السوبرين فى جدر الأوعية كجزء من إستجابة العائل للإصابة البكتيرية. إن العناصر الوعائية فى نبات الأقحوان السليمة تفتقر إلى مادة السوبرين بكميات يمكن تقديرها ولم يوجد مثل هذه التغيرات يمكن أن تحدث فى أوعية النباتات المصابة بالفيرويد. زايدة على ذلك فلقد وجد أن مسبب مرض بيرس فى العنب يؤدى إلى إنتفاخ الأغشية المغلفة للنخاع وقفل ميكانيكى للنخاع بواسطة إنتاج الكثير من الصمغ أو الجيل، ولا يوجد أى دليل على أن الفيرويد يسبب إنتاج صمغ أو تغير فى النخاع والذى يمكن أن يؤدى إلى إعاقة **حركة البكتيريا خلال نسيج النبات. إن بقاء البكتيرية حية فى النباتات المصابة** بالفيرويد يكون دليل ضد إفتراض أن هناك مواد خاصة تنتج تكون مميتة للبكتيريا. إن دراسة التكاثر البكتيرى والانتاج الأنزيمى فى النسيج المصاب يمكن أن يظهر أن البكتيريا إما أن تكون غير قادرة على إنتاج كميات عادية من الأنزيمات المحللة أو أن هذه الأنزيمات تكون غير قادرة على تفكيك نسيج النبات. يمكن دراسة الخلية البكتيرية الخالية من الأنزيمات واستعمالها فى هذا الغرض.

ب ـ مرض الشحوب المتبقع فى الأقحوان

Chrysanthemum Chlorotic Mottle Disease

كان أول وصف لهذا المرض فى أوائل الخمسينات وكان يعزى إلى مسبب فيروسى، استمرت الأبحاث عليه حتى سنة ١٩٧١ حيث أثبت Dimock et al أن هذا المرض يتسبب عن فيرويد وذكر أن أعراض الشحوب المتبقع التى تظهر فى الأقحوان **Chrysanthemum morifolium** من المستبعد أن تتسبب عن إصابة فيروسية. وفى أبحاثه أثبت أن مسبب هذا المرض يشبه مسبب مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس ومسبب مرض تقزم الأقحوان.

الأعراض:

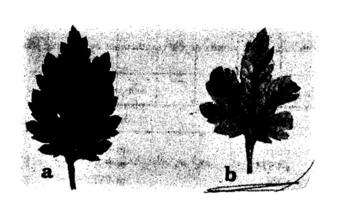
تظهر أوراق النباتات المصابة بلون أصفر شاحب يتخلله بقع متفاوتة فى اللون الأخضر من الفاتح حتى الغامق. هذه الأعراض تكون المرحلة الأخيرة من الإصابة، أما فى البداية فهو يشبه أعراض الموزايك المتسبب عن الفيرس، لذلك يحدث التباس فى تشخيص هذا المرض وتمييزه عن الأمراض الفيروسية. قد تظهر الأعراض على عدة أوراق على النبات وقد تكون معظم الفروع مصابة. يضعف النبات وتتساقط الفروع القريبة من سطح التربة بعد أن تضعف. النباتات الشديدة الإصابة تظهر باللون الشاحب. كما سبق وذكرنا يكون هناك إلتباس فى أعراض هذا المرض مع الأعراض الأخرى وخاصة الموزايك الفيروسى ونقص العناصر الغذائية فى التربة، إلا أن التبرقش الأخضر على سطح الورقة المصفرة هو الذى يميز الإصابة بهذا الفيرويد عن بقية الأمراض الأخرى شكل ٦٦.

المسبب:

يتسبب هذا المرض (مرض الشحوب المتبقع فى الأقحوان) عن فيرويد Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid ويكتب (ChCMVd). يبدو

أن هذا الفيرويد يختلف تماماً عن بقية الممرضات الأخرى فهو يصيب وبسبب الأعراض المرضية على نباتات الأقحوان فقط. للفيرويد المقدرة على أن يصيب النباتات التى تكون قد أصيبت مسبقاً بأى فيرويد آخر وليس عنده القدرة على الحفظ أو الوقاية بالتضاد. لقد استعمل مع كثير من الفيرويدات فى تجارب الوقاية بالتضاد فلم يثبت بأن عمل وقاية للنبات من أى فيرويد متحدى آخر. من الصعب صبغ مستحضرات هذا الفيرويد بمادة Toluidine blue .

إن صفات هذا الفيرويد تختلف عن بقية الفيرويدات حيث أن المدى العائلى له منحصر فقط فى بعض أنواع الأقحوان مثل Bonnie Jean ، Deep Ridge ، Mistletoe . كذلك فإن إنتقال الفيرويد بالعصارة صعب. أما تتابع النيوكليتيدات فى هذا الفيرويد ووضعه التصنيفى لم يتأكد بعد. يمكن أن تفقد حيوية الفيرويد بسرعة فى المستخلص وكذلك طريقة الاستخلاص تؤثر على حيوية الفيرويد حيث جداول ٣٩، ٤٠ تبين بعض صفات هذا الفيرويد.



شكل رقم ٦٦ :

أعراض الإصابة على أوراق نبات الأقحوان بالفيرويدChCMVd . الورقة a سليمة والورقة B تظهر أعراض الشحوب المتبرقش.

جدول ٣٩ : تأثير رقم الحموضة على ثبات فيرويد ChCMVd فى المستخلص الخام.

المادة المخففة للمستخلص تركيز ٠,١ مول	عد ساعات التحضين	٪ حيوية المستخلص فى درجة حموضة						
		٥,٥	٦,٢	٦,٥	٧,٥	٨,٥	٩,٥	١٠,٥
Tris - moleate - HCl	صفر	صفر	—	٢٠	٧٠	—	—	—
	٢	صفر	—	صفر	٣٠	—	—	—
Tris - HCl	صفر	—	—	—	٥٠	٨٠	—	—
	٢	—	—	—	٥٠	٩٠	—	—
Boric acid - NaOH	صفر	—	—	—	١٠٠	٩٠	—	—
	٢	—	—	—	—	١٠٠	٩٠	—
Glycine - NaOH	صفر	—	—	—	—	—	٩٠	٤٠
	٢	—	—	—	—	—	٧٠	٣٠
NaCO3	صفر	—	—	—	—	—	—	٦٠
	٢	—	—	—	—	—	—	صفر
water	صفر	—	صفر	—	—	—	—	—
	٢	—	صفر	—	—	—	—	—

ملاحظات:

كان يستعمل إختبار الحيوية مباشرة بعد التحضير وثانية بعد التحضين لمدة ٢ ساعة على درجة حرارة الغرفة العادية. كان يستخلص من النسيج فى Specified diluent (١٠ مل / غرام) ويضبط رقم الحموضة باستعمال ٢ نظامى من هيدروكسيد الصوديوم و ٢ نظامى حمض HCl.

جدول ٤٠ : حيوية وثبات الفيرويد بعد طرق الاستخلاص المختلفة.

طريقة الاستخلاص	٪ الحيـويـة							
	تخفيض المستخلص			عدد أيام التحضين على درجة ٤ْم				
	صفر	١٠-١	١٠-١,٥	صفر	١	٣	٧	٢٨
Borate buffer	٦٠	٤٠	صفر	٦٠	١٠٠	٤٠	٣٠	صفر
Borate buffer + chloroforum n - butanol	١٠٠	٤٠	صفر	٩٠	١٠٠	٨٠	٧٠	٧٠
Borate - SDS - buffer + Phenol	٦٠	٦٠	٢٠	٧٠	٩٠	٦٠	٦٠	٦٠
Borate - SDS - buffer + DEP	٤٠	صفر	صفر	٣٠	٢٠	٣٠	صفر	—
water	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر

ملاحظات:

١ ــ كان يستخلص النسيج فى ٠,٢ مول بوريك أسد ــ هيدروكسيد صوديوم، ٥ ملى مول كلوريد مغنيسيوم حموضة (٩). (٢ مللتر / غرام) والمتجانس ينقى بالسرعة المنخفضة بآلة الطرد عن المركز قبل الاختبار.

٢ ــ تختبر النباتات المريضة بعد ٣٠ يوم من الحقن وتحسب النسبة المئوية بين عدد النباتات المريضة والمحقونة.

٣ ــ بيئة الاستخلاص تحتوى كلوروفورم ــ n ــ بيوتانول (١ مل / غرام).

٤ ــ Borate buffer تحتوى ١ ٪ SDS.

٥ ــ كان يستعمل الماء بدلاً من المنظم فى التجربة الكنترول.

٥ ـ فيرويدات حشيشة الدينار

Hop Viroids

أ ـ مرض تقزم حشيشة الدينار

Hop Stunt Disease

مقدمة عن نبات حشيشة الدينار:

قبل أن نتكلم عن الأمراض الفيرويدية الهامة والخاصة بنبات حشيشة الدينار وحيث أن هذا النبات لا يزرع فى بلدان الشرق الأوسط، نود أن نعطى فكرة عن الوصف النباتى لهذا النبات.

يسمى نبات حشيشة الدينار باللغة العربية الفصحى (جنجل) واسمه العلمى **Humulus lupulus** ويتبع العائلة القنابية Fam. Cannabinaceae. والأصل فى تسميته بهذا الاسم غير معروف ولكن يبدو أن كلمة Humulus مأخوذة من كلمة Humus ومعناها رطب وهى تشير إلى الأرض الرطبة التى ينمو فيها النبات. أما كلمة **Lupulus** معناها الذئب وتشير إلى صفة من صفات النبات حيث أنه يخنق العائل الذى يتسلق عليه مثل الذئب الذى يخنق فريسته.

لايزرع نبات حشيشة الدينار فى منطقة الشرق الأوسط ولكنه يزرع بكثرة فى اليابان وانجلترا وفرنسا والولايات المتحدة الأمريكية وقد إنتشرت زراعته فى أماكن متفرقة من العالم مثل أمريكا الجنوبية وأستراليا أما موطنه الأصلى فهو أوروبا وأسيا.

نبات حشيشة الدينار عشب معمر متسلق ويلزم له دعامات أو سنادات فى الحقل لسيتند عليها، يعيش فى الأرض من ١٠ ـ ١٥ سنة ويصل ارتفاعه إلى عشرة أمتار له أوراق بيضاوية الشكل ويحمل النبات أزهاراً مؤنثة وأخرى مذكرة لونها أصفر مخضر قليلاً وتوجد الأزهار فى نورات شبه مخروطية شكل ٦٧ . الأزهار المؤنثة أكبر حجماً من الأزهار المذكرة. يوجد فى قواعد الأزهار قنابات ويوجد على قواعد هذه القنابات غدد تحتوى على الزيت الطيار العطرى وهذه الزيوت هى التى تعطى النورة رائحتها وطعمها المميز لحشيشة الدينار. تستعمل المخاريط الثمرية الأنثوية فى العمليات الصناعية حيث هى التى تحتوى شعيرات غزيرة توجد فيها المكونات الفعلية المستفاد منها.

تتكاثر حشيشة الدينار إما بالبذور أو بالعقلة وتفضل الطريقة الأخيرة وهى المنتشرة فى أوربا وأمريكا لسهولتهاحيث تزرع العقل فى مشاتل ثم بعد التجذير تنقل إلى الأرض الدائمة. تجمع المخاريط الزهرية فى شهر سبتمبر من كل عام إبتداءً من العام الثالث، عندما يتم نضجها ويتم الجمع فى الصباح الباكر وتنقل إلى حجرة التجفيف الصناعى مباشرة حتى لا يتغير لونها. يعطى الهكتار الواحد حوالى ١٢ ـ ٢٢ طن من الثمار المخروطية فى الجمعة الواحدة. يستمر النبات يعطى إنتاج لمدة عشرة سنوات.

تستعمل حشيشة الدينار أساساً فى صناعة البيرة حيث تكسبها الطعم المر وهو مرغوب فى صناعة البيرة. كذلك فإن لحشيشة الدينار قيمة حافظة لوجود مواد راتنجية فيها. كذلك فإن حشيشة الدينار عندها قدرة على تكوين رغوة Froth وذلك للأحماض والمواد الراتنجية الموجودة فيها. أما زيت بذرة حشيشة الدينار فهو منوم ومسكن خفيف ويستعمل لتهدئة الأعصاب.



شكل رقم ٦٧ :

يبين شكل الورقة والمخروط فى حشيشة الدينار.

أهم مكونات حشيشة الدينار هو الزيت الطيار الموجود فى غدد زيتية وشعيرات غدية فى النورة المخروطية بنسبة تتراوح من ٠,٣ ـ ١ ٪ ويستخلص الزيت بواسطة عملية التقطير وله رائحة نفاذه وطعم مر ويحتوى على مادة Humulene وهو يتبع مجموعة Sesquiterpenes . بالإضافة إلى الزيت الطيار تحتوى المخاريط الزهرية مواد راتنجية منها Humulone ومادة Lupulone ويرجع إليها الطعم المر الداخل فى صناعة البيرة. كذلك يوجد حمض Lupulinic ومواد تنينيه Humulo وكذلك كحول Geraniol .

مرض تقزم حشيشة الدينار:

كان أول وصف لهذا المرض بواسطة العالم Yamamoto et al سنة ١٩٧٠ فى اليابان وذكر أن النباتات المريضة تكون ذات عقل قصيرة خاصة فى الساق الرئيسى والفروع الجانبية وتتجعد الأوراق العليا وتلتف إلى الجهة السفلية ويصغر حجم نصل الورقة وتصفر الأوراق وتسقط أحياناً، تتقزم النباتات. بعد ذلك كثير من الباحثين وصف المرض. إن هذا المرض قد نال قسطاً وافياً من الأبحاث مثل مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس ومرض تقزم الأقحوان وهو لا يقل عنهما شأناً من الناحية العلمية.

إصابة نباتات حشيشة الدينار بفيرويد تقزم حشيشة الدينار يؤدى إلى خفض فى معدل النمو ولكنه لا يؤثر على معدل تكوين وخروج الأوراق ولا على إختفاء التركيب شبه المطوى الذى يغطى خلايا الابيدرمز. المخاريط الناتجة والمأخوذة من النباتات المصابة تكون صغيرة الحجم محتوياتها من الأحماض الاليفاتية منخفضة إلى النصف أو الثلث بالمقارنة مع النباتات السليمة. كذلك فإن الغدد (اللوبيولين Lupulin) تكون موزعة وأكثر إنتشاراً على القنيبات وعلى الأغلفة الزهرية وينخفض عدد هذه الغدد بنسبة تصل ٦٠٪ مقارنة مع النباتات السليمة. بالفحص والتصوير بالميكروسكوب الالكترونى تبين أن معظم الغدد اللوبيولينية الموجودة على أغلفة المخروط من النباتات المصابة تنكمش كثيراً وتذبل. أما الحبيبات الكروية (١,٢ ـ ١,٩ مليميكرون) لم تلاحظ على سطح هذه الغدد فى المخاريط المصابة.

أما خلايا الغدد الراتنجية فى المخاريط المصابة جهازياً، عند الفحص الدقيق لها وجد أنها تختلف فى نقطتين أساسيتين الأولى: الخلايا المصابة تكون ذات جدر خلوية مشوهة. الثانية: يظهر نقص كبير فى المواد Electron dens substance، وقد إكتشف أن هذه المواد تكون على شكل أملاح غير ذائبة والتى تكون مساوية لجزيئات الأحماض الالفاتية من المواد الراتنجية المفرزة بواسطة الغدد الراتنجية.

عند فحص القمم المرستيمية من نباتات حشيشة الدينار المصابة بفيرويد التقزم لملاحظة التغيرات السيتوبلازمية لم يلاحظ أى تغيرات فى قمة الفرع لغاية طول ٠,٢ ملم (هذه المنطقة تحمل القمة المرستيمية وزوجان من بداية الأوراق) ولكن فى خلايا الطبقة الثالثة من الأوراق المحيطة بالقمة لوحظت جدر الخلايا غير منتظمة واسمك منها فى النباتات السليمة، هذه الاضطرابات فى جدر الخلية تزداد لغاية الطبقة الخامسة المحيطية من الأوراق بالقمة وتزداد بزيادة الإصابة. كذلك بالإضافة لتشوة الجدر الخلوية يظهر عدم تعضى فى البلاستيدات الخضراء. أما أجسام Paramural فلم يطرأ عليها تغيير نتيجة الإصابة. أما جدر النواة والميتوكندريا

والرايبوسومات وجهاز الغشاء السيتوبلازمى لم يحدث عليهما تغيرات نتيجة الإصابة الفيرويدية. كما وجد بأن الإصابة الفيرويدية تسبب نقصاً فى التجذير ويكون هناك إضطرابات فى المحتوى الهرمونى فى النبات وخاصة هرمون أندول أستك أسد والسيتوكاينين.

مسبب المرض:

يتسبب مرض تقزم حشيشة الدينار عن فيرويد تقزم حشيشة الدينار(HSVd) Hop Stunt Viroid هذا الفيرويد يتكو ن من ٢٩٧ نيوكليتيدة متتابعة وقد يصل التتابع فى بعض السلالات إلى ٣٠٣ نيوكليتيدة. للفيرويد صفات ممرضة وصفات كيماوية مشابهة لفيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار CPFVd ولكنه يختلف عن صفات فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd. للفيرويد HSVd كفاءة ترسيب منخفضة، كذلك فإنه لا يثبط بالفينول أو الكلوروفوم، ويستخلص بالفينول ويترسب بالايثانول. درجة حرارة التثبيط للفيرويد ٨٤°م لمدة عشرة دقائق. أما درجة التخفيف القصوى فى العصارة ١ : ٢٥٠٠. كما أن الفيرويد يفقد حيويته فى تخفيف ١ : ١٠٠٠٠ إذا حفظ يوم واحد على درجة حرارة ٢٠°م ولكن ليس أكثر من ثلاثة أيام على درجة ٤°م. عندما تترك أجزاء النبات والأوراق والمخاريط لتجف بالشمس فإن حيوية الفيرويد تفقد كلية خلال ٣ شهور.

طول الفيرويد إذا كان فى الشكل المستقيم شبه العصوى ٨٠ نانوميتر. وزنه الجزيئى ١٠٠٠٠٠ دالتون. لا ينتقل الفيرويد خلال حبوب اللقاح ولا البويضات. يمكن أن يبقى الفيرويد حياً فى الجهاز الجذرى لنباتات حشيشة الدينار خلال شهور الشتاء. ينتقل الفيرويد ميكانيكياً وتكون النتيجة أفضل عندما يتم الحقن فى الأوراق الأولى حول القمة النامية. كما أنه ينتقل إلى نباتات الخيار **Cucumis sativum**. تظهر الأعراض النموذجية بعد ١٤ ـ ١٦ يوم من الحقن. درجات الحرارة أعلى من ٣٠°م تلائم تكشف الأعراض الخارجية. درجة الحموضة المثلى لاستخلاص الفيرويد ٨ ـ ٩,٥ pH وأفضل طريقة فصل (استخلاص) تكون بمنظم High salt alkaline.

عند إجراء عملية فهرسة للنباتات المصابة بالفيرويد، يلاحظ أن النباتات المصابة بالفيرويد HSVd لا يلاحظ عليها أعراض فى السنة الأولى من حيث المظاهر الخارجية ولا النقص فى محتوى الأحماض الاليفاتية. أما فى السنة الثانية يمكن ملاحظة هذه الأعراض.

ولقد ذكر أن الفيرويد يكون موجوداً فى أجزاء النواة فى خلايا العائل المصاب ويكون تناسخه فى النوية. يكون الفيرويد HSVd كما فى بقية الفيرويدات موجوداً على شكلين الأول شكل مستقيم والثانى دائرى وإن كلا الشكلين يكون معدياً ويسبب مرض تقزم حشيشة الدينار.

كما وجد بأن cDNAs ثنائى الخيط المحتوى من ١ إلى ٣ وحدات طول متتابعة من HSVd يكون معدى، وأن نباتات الخيار المحقونة بهذا التركيب تكون أعراضها غير مميزة عن أعراض الإصابة بفيرويد HSVd كما فى جدول رقم ٤١ .

جدول ٤١ : الاختبارات الحيوية لفيرويد HSVd والأجزاء من ds - cDNA المحتوية أكثر من وحدة طول من RNA الخاص بالفيرويد، على نباتات الخيار الكاشفة.

الأحماض النووية فى التجربة	التركيز ميكوغرام / مللتر	* ٪ حيوية الفيرويد بعد ٢٠ يوم	٢٨ يوم	٣٥ يوم
Bam H 1 - 1 unit	٢	١٧	٣٤	٣٤
	٠,٤	صفر	صفر	صفر
Bam H 1 - 2 unit	٢	١٠٠	١٠٠	١٠٠
	٠,٤	٤٠	٤٠	٦٠
Bam H 2 - 3 unit	١,٥	صفر	٨٠	١٠٠
	٠,٣	١٦	٧٢	٩٣
HSVd RNA	٠,٥	٢٥	١٠٠	١٠٠
	٠,١	٥٠	١٠٠	١٠٠
كنترول ـ ماء	صفر	صفر	صفر	صفر

* كانت تحسب النسبة المئوية بحساب عدد النباتات المصابة على النباتات المحقونة.

كذلك فقد وجد أن التتابع الضرورى وجوده لكى يكون الحمض النووى معدى هو ٦٠ وحدة متتابعة مرتبة مرتين من الفيرويد HSVd من منطقة A (كما يأتى فى السلالات). إن منطقة A هى الحساسة ولها دور كبير فى إحداث العدوى. إذا تكون تركيب لا يحوى الستين نيوكليتيدة المتتابعة من منطقة A فلايكون هذا التركيب معدى.

العوائل المشخصة :

يعتبر نبات الخيار أكثر العوائل حساسية للكشف عن فيرويد HSVd. إن إختبار PAGE للخيار للكشف عن الفيرويد يحتاج ٩ ساعات. أما إنتظار ظهور الأعراض على نبات الخيار فيحتاج ٣٠ يوماً.

من العوائل المشخصة الهامة والمعروفة للفيرويد هى :-

1 - **Gynura aurantiaca**	3 - **Benincasa hispida**
2 - **Lycopersicon esculentum**	4 - **Cucumis sativus**
5 - **C. melo**	6 - **Lagenari siceraria**
7 - **L. Siceraria Var. siceraria**	8 - **L. S. Var. microcarpa**
9 - **Phaseolus vulgaris**	10 - **Helianthus annuus**

تظهر أعراض الفيرويد على نبات الخيار **C. sativus** على شكل تقزم، إبيضاض أو شفافية العروق، تجعد الورقة بعد ١٤ ـ ١٧ يوم من الحقن. كذلك فإن أعراض المرض تظهر على الخيار **C. melo** على شكل تقزم، تجعد الورقة وحدوث نكروزز فى قمة الورقة بعد ١٦ ـ ٢٢ يوم من الحقن وتموت أحياناً النباتات المصابة بشدة. أما بالنسبة لنباتات الطماطم فتكون الأعراض غير ظاهرة ويكون تركيز الفيرويد فيها منخفضاً عنه فى نباتات الخيار. لا ينتقل الفيرويد مع بذور الطماطم **L. esculentum**.

يكون تأثير وسلوك الفيرويد HSVd والفيرويد (الثمرة الباهتة فى الخيار) CPFVd فى الجيل متماثلاً ويشابه 7S RNA المستخلص من النباتات السليمة.

ولقد ثبت فى بعض التجارب التى أجريت فى اليابان سنة ١٩٨٩ أن نبات الدخان **Nicotiana tabacum** يعتبر عائل لفيرويد HSVd بعد أن بقى لعدة سنوات يقال بأن نباتات الدخان مقاومة للإصابة بالفيرويد HSVd. وتمت هذه النتيجة بناءً على التجارب التى أدخل فيها HSVd - cDNA فى نبات الدخان بواسطة بلازمد Ti واكتشف تناسخ الفيرويد فى نباتات الدخان المحولة وراثياً Transgenic. ولقد إختبرت قابلية الدخان للإصابة بالفيرويد بطريقتين مختلفتين الأولى بالحقن عن طريق بكتيريا **Agrobacterium** والتى تسمى Agroinfection inoculation. أما الطريقة الثانية فهى الطريقة الميكانيكية العادية. مع أن الطريقة الميكانيكية كانت تستعمل فى التجارب السابقة، إلا أنها كانت تفشل فى نقل الفيرويد لنبات الدخان ويرجع سبب الفشل لعدم وجود التركيز الكاف من الفيرويد وحيث أن الخطوة الأولى فى الإصابة تكون بتثبيت الفيرويد وترجمته فى السيتوبلازم، وبالتالى فإن عدم كفاءة النقل الميكانيكى فى حقن الدخان يكون لعدم كفاءة نقل الفيرويد من السيتوبلازم إلى النواة.

التخلص من الفيرويد:

كما هو معروف فإن فيرويد HSVd ينتقل ميكانيكياً وحيث أن هذا الفيرويد يتأثر بكثير من المحاليل الكيماوية مثل ١ ٪ فورمالدهيد، ١ ٪ صوديوم هايدروكسايد، ٥ ٪ صوديوم هايبوكلورايد ٥ ٪ تراى صوديوم فسفيت، ٢ ٪ فورمالدهيد. كذلك يوصى باستعمال محلول ٥ ٪ كالسيوم هايبوكلورايت. كذلك فإن تسخين أنصال السكاكين الملوثة لمدة ١٠ دقائق على درجة حرارة ١٦٠°م كانت فعالة فى التخلص من الفيرويد. كذلك فإن تعريض الفيرويد لدرجة حرارة ١٤٠°م تمنع إنتقال الفيرويد.

يمكن منع النقل الميكانيكى عن طريقى غمر مقصات التقليم وسكاكين

القطع والأدوات الزراعية المستعملة فى الحقل لمدة عشرة دقائق فى أى من المحاليل السابقة الذكر.

سلالات الفيرويد:

إن فيرويد HSVd من الفيرويدات ذات السلالات الكثيرة وكل سلالة من هذه السلالات تستخلص من عائل نموذجى لها وتوضع أو تصنف السلالات المتقاربة جداً فى زمرة معينة كما فى جدول ٤٢ وشكل ٦٨.

جدول ٤٢ : سلالات فيرويد حشيشة الدينار وأماكن وجودها.

زمرة السلالة والعائل	اسم السلالة	منطقة إنتشار السلالة	عدد النيوكليتيدات	الاختلاف فى النيوكليتيدات			٪ تماثل السلالات
				استبدال	دخول	حذف	
Hop Type	Hop Stunt Viroid	اليابان	—	—	—	—	—
Hop	HSVd - hop	اليابان	٢٩٧	—	—	—	٪١٠٠
Peach	HSVd - Peach (A9)	اليابان	٢٩٧	١	صفر	صفر	٩٩,٧
Grapevine	HSVd - Grapevine	الصين،اليابان*	٢٩٧	١	صفر	صفر	٩٩,٧
Plum Type	Hop - Plum Viroid	اليابان	—				—
Plum	HSVd - Plum	اليابان	٢٩٧	١٣	٣	٣	٩٣,٦
Peach	HSVd - Peach	اليابان	٢٩٧	١٣	٣	٣	٩٣,٦
Citrus Type	Hop - Citrus Viroid	اليابان	—				—
citrus	HSVd - Citrus - 1	اليابان	٣٠٢	٧	٧	٢	٩٦,٣
citrus	HSVd Citrus - 2	اليابان	٣٠٢	٧	٦	١	٩٧
cucumber	HSVd - cucumber	نذرلان	٣٠٣	٨	٧	١	٩٦,٣

* ينتشر الفيرويد فى كل من أمريكا ـ استراليا ـ فرنسا ـ اسبانيا ـ هنجاريا.

لقد وجد أن الفيرويدات المستخلصة من البرقوق Plum والخوخ Peach تكون متقاربة جداً مع فيرويد HSVd على أساس الصفات المرضية التى تسببها على نباتات العائلة القرعية (الخيار) وإن طريقة التحليل بواسطة PAGE، التهجين الجزيئى، تماثل تتابع النيوكليتيدات وأعراض هذه الفيرويدات على نباتات الخيار صنف (Suyo) كانت تقريباً نفس الأعراض المتسببة عن فيرويد HSVd المأخوذ من حشيشة الدينار والمأخوذ من العنب والمأخوذ من الخيار والمأخوذ من الحمضيات تحت نفس ظروف الصوبا الزجاجية. إن المدى العائلى للفيرويد المأخوذ من DF - plum يشابه الفيرويد المأخوذ من حشيشة الدينار والمأخوذ من الخيار. هناك فرق بسيط فى المدى العائلى أمكن تمييزه على نباتات الطماطم، فقد ذكر أنه لغاية ١٩٩٠ فإن عزلة DF - plum لم يبدو أنها تصيب الطماطم ولكن الفيرويدات HSVd المعزولة من حشيشة الدينار والعنب والخيار والحمضيات تصيب الطماطم بدون إحداث أعراض ظاهرة.

التهجين الجزيئى وتحليل التتابع أظهر أن كلا الفيرويدين فيهما أكثر من ٩٠٪ تماثل تتابع مع عزلات HSVd. وبشكل خاص فإن عزلة DF - peach - A9 كانت تختلف بنيوكليتيدة واحدة عن HSVd المعزول من حشيشة الدينار و ٢ نيوكليتيدة فقط عن HSVd المعزول من العنب وبالتالى عرفت هذه الفيرويدات على أنها سلالات خوخ من HSVd ويشار إليها HSVd - peach. إن هذه العزلات الثلاثة متقاربة جداً مع بعضها البعض وتشكل زمرة واحدة تسمى زمرة حشيشة الدينار Hop type. ومن ناحية أخرى فإن سلالات DF - plum وDF - peach - AF لها نفس التتابع وهى بعيدة القرابة عن زمرة Hop type من مجموعة HSVd وهى أكثر قرابة وصلة مع عزلات HSVd من العنب الألمانى. وإن هذه العزلة الأخيرة تختلف فى ثمانية مواقع عن الفيرويد المعزول من حشيشة الدينار HSVd - hop وأن سبعة من هذه الثمانية هى نفس النيوكليتيدات فى DF - peach AF مع أن- DF

peach - AF تختلف بزيادة ١٢ موقع عن HSVd - hop، العزلة تكون نموذجية كما فى سلالة HSVd المأخوذة من البرقوق plum ويشار إليها HSVd - plum أو[HSVd - peach - AF] إن HSVd - plum و HSVd grapevine يبدو أنها تشكل زمرة البرقوق وتكتب plum type من مجموعة HSVd.

زيادة على ذلك فإن العزلات المأخوذة من الخيار والحمضيات المذكورة سابقاً متقاربة جداً مع بعضها البعض وتشكل زمرة الحمضيات Citrus type من مجموعة فيرويدات HSVd.

فى السنوات الأخيرة تم اكتشاف عزلات من HSVd من أنواع مختلفة من النباتات فى كثير من أقطار العالم ويمكن تصنيفها إلى ثلاثة زمر كما ذكر سابقاً وهذه الزمر الثلاثة هى زمرة حشيشة الدينار Hop type وزمرة البرقوق Plum type وزمرة الحمضيات Citrus type.

إن التحليل المقارن لتتابع نيوكليتيدات هذه الزمر يظهر وجود منطقة محفوظة ومنطقة متغيرة فى جزئ HSVd. الجزء العلوى من المنطقة المركزية المحفوظة (ذات القواعد من ٦٠ ـ ١١٤ فى السلالة المأخوذة من حشيشة الدينار HSVd - hop) نهاية اليد اليسرى ٢٦٧ إلى ٢٤ فى HSVd - hop، والجزء من اليد اليمنى من جزئ HSVd محفوظ (شكل ٦٨).

إن أهمية الجزء العلوى من المنطقة المركزية المحفوظة (على الشكل Region A) يكون فى تناسخ الفيرويد HSVd. إن المنطقة المركزية المحفوظة فى الجزء العلوى الملاحظة فى العزلات الطبيعية من HSVd متوافقة دائماً مع منطقة A فى الشكل والذى من المعتقد أنه يتضمن وصل الأزواج المستعملة فى تكاثر الفيرويد. بالإضافة إلى ذلك فإن الجزأين الأخيرين المشار إليهما سابقاً هى أيضاً ستكون مهمة فى تكاثر فيرويد HSVd، بسبب ثلاثة طافرات محدثة فى هذا الجزء عن طريق إحداث

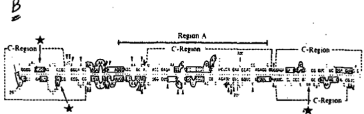
طفرات فى المعمل والتى تجعل HSVd غير معدى. من ناحية أخرى فإن هناك مناطق مختلفة موجودة على جانبى المنطقة المركزية المحفوظة. إن الموقع الموجود عليه واحد منها فى الجهة اليسرى متوافق مع منطقة تغيير المرضية فى فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وفيرويد اكسوكورتز الحمضيات مع أن جميع عزلات HSVd تحدث أعراضاً متشابهة على نباتات الخيار.

بالاعتماد على نتائج حقن العصارة والتحليل بواسطة PAGE يبدو أكثر احتمالاً بأن HSVd - plum يسبب مرض تنقر الثمرة على البرقوق صنف Taiyo. بالإضافة لذلك، على نبات الخوخ فإن HSVd - peach (AF) والذى هو مرادف للاسم HSVd - plum أو HSVd - peach - A9 يبدو أنهـا مترافقة مع أعراض تنقر الثمرة. إن هاتين العزلتين لهما تتابع نيوكليتيدات مختلف. إن HSVd - peach (AF) المعزول من الخوخ والتى تظهر أعراض تنقر الثمرة الشديدة لها نفس تتابع النيوكليتيدات كما فى HSVd - plum المأخوذة من الأعراض النموذجية لتنقر الثمرة فى البرقوق، ولكن HSVd - peach (A9) المعزولة من الخوخ المظهرة أعراض تنقر الثمرة البسيطة لها تتابع نيوكليتيدات مختلف.

نظراً لأن فيرويد HSVd المكتشف فى نباتات حشيشة الدينار اليابانية، فيه مجموعة مماثلة من هذه العوامل تسمى HSVd - group، قد تبين بأنها منتشرة بين أنواع عديدة من أشجار الفاكهة مثل العنب، الحمضيات، الخوخ والبرقوق، فإن بعضاً من هذه السلالات من فيرويد HSVd تسبب أمراضاً خطيرة على ال hop، الخيار، البرقوق وأحياناً الخوخ ولكنها تصيب العنب والحمضيات ومن المحتمل أن يكون لهذه النباتات (العنب والحمضيات تفاعل معين مع هذا الفيرويد HSVd).







شكل رقم ٦٨ :

A: مقارنة بين تتابع النيوكليتيدات فى DF - plum وDF - peach A9 وDF - peach AF التابعة إلى مجموعة HSVd. النيوكليتيدات المختلفة عن تلك التى فى HSVd يشار إليها بأسهم.

B: المناطق المحفوظة والمتغيرة فى جزئ HSVd (◣) تدل على المواقع حيث التغير فى تتابع النيوكليتيدة قد تميز بين السلالات. (▭) تدل على نهايات التتابع المشترك لفيرويد HSVd مع تلك فى فيرويد PSVd. (✦) تدل على مواقع الطفرات التى تجعل HSVd غير معدى عن طريق استعمال تكنيك الطافرات فى المعمل. C - Region تمثل المناطق المحفوظة. يلاحظ منطقة A الهامة فى تركيب الفيرويد.

ب ـ الفيرويد الكامن في حشيشة الدينار

Hop Latent Viroid

كان أول ذكر لمرض غير معروف المسبب يظهر على نباتات حشيشة الدينار فى اليابان سنة ١٩٧٧ بواسطة كل من Sasaki & Shikata وذكر هذان العالمان أن هناك بعض الخفض فى إنتاجية حشيشة الدينار ويوجد بعض الاضطرابات التركيبية فى المحتويات من الأحماض والراتنج الموجود فى النباتات المصابة، إلا أنهم لم يذكروا مسبب هذا المرض.

فى سنة ١٩٨٠ ظهرت خسائر واضحة فى جميع زراعات حشيشة الدينار، وبالرغم من أن الخسائر الاقتصادية كانت واضحة فى الانتاج، إلا أن مسبب المرض لم يحدد لأنه لا يوجد أعراض ظاهرة خارجية يمكن تمييزها على النبات وكانت الخسائر تقدر بدون الاعتماد على اسم المرض.

فى سنة ١٩٨٧ ذكر فى أسبانيا أن فيرويد وجد بالمصادفة أثناء الكشف عن فيرويد تقزم حشيشة الدينار، يرافق زراعات حشيشة الدينار وهو مميز عن فيرويد تقزم حشيشة الدينار، وقد إعتقد الباحثون أن هذا الفيرويد له علاقة مع بعض المظاهر المرضية فى هذا النبات. فى سنة ١٩٨٨ كان أول وصف علمى لهذا الفيرويد فى اليابان وذلك من قبل كل من Ramm & Sanger و Puchta وهذا الوصف مذكور فى مجلة .Nucleic acid Res. العدد ١٦ صفحة ٤١٩٧ ــ ٤٢١٦.

سمى الفيرويد باسم الفيرويـد الكامـن فى حشيشة الدينار Hop Latent Viriod ويكتب HLVd. ينتشر هذا الفيرويد فى بريطانيا، اليابان، نذرلاند وأسبانيا.

الأعراض غير المنظورة:

ينتشر هذا الفيرويد فى معظم زراعات حشيشة الدينار فى العالم. يوجد فى النبات بدون إظهار أعراض مرئية، إلا أن هناك خسائر تعتبر أعراض غير مرئية تلاحظ فى

النباتات المصابة. يكون إنتاج المخاريط فى النباتات المصابة أقل منه فى النباتات غير المصابة. كذلك فإن وزن المخروط يقل فى النباتات المصابة بنسبة ٨ ٪ عنه فى النباتات السليمة، وبالتالى فإن الانتاج الكلى ينخفض ويصل خفض الإنتاج حوالى ٣٥ ٪. كذلك تنخفض نسبة الأحماض الأليفاتية فى النباتات المصابة بنسبة ٣٠ ٪ عنها فى غير المصابة، فى بعض الأصناف يكون الخفض ١٥ ٪ فقط. أما أحماض بتا والتى هى beta - acids ترتفع فى النباتات المصابة بالفيرويد عنها فى النباتات السليمة. تنضج المخاريط فى النباتات المصابة قبل النباتات السليمة.

هناك بعض الملاحظات المرئية قد تعتبر أعراض نتيجة الإصابة بالفيرويد، من هذه الملاحظات تكون النباتات غير المصابة ذات لون أخضر هذا الخضار أشد منه فى النباتات المصابة والمجاورة وتكون هذه النباتات أكثر قوة More Vigorous بحيث أنها تصل بسهولة إلى الأسلاك الموجودة فى قمم السنادات (النبات متسلق ويصل النوع فى بريطانيا إلى طول خمسة أمتار ويعتمد على سنادات) وتعطى نموات طرفية غزيرة. كذلك فإنه قبل موسم الجمع فى سبتمبر يكون التمييز بين النباتات المصابة وغير المصابة غير لافتاً للنظر من حيث قوة النبات. النباتات المصابة تسمى النباتات غير القوية non - Vigorous. وثبت بالتجربة أن جميع النباتات غير القوية-non - Vigorous مصابة بالفيرويد أما النباتات القوية تتراوح نسبة وجود الفيرويد فيها من ٥ ٪ – ١٥ ٪ ويلاحظ فى جدول ٤٣ تأثير الإصابة على كثير من محتويات المخاريط.

جدول ٤٣: الإنتاج وصفات المخاريط لنوع Omega من حشيشة الدينار مصاب بالفيرويد HLVd وأخرى غير مصابة.

حالة النبات	إنتاج المخاريط بالغرام / طازج	حجم المخروط عند الجفاف	القيمة الوصلية	٪ الأحماض الأليفاتية	٪ أحماض بتا	كوهميولين فى أحماض ألفا ٪	كوليوبيولين فى ٪ أحماض بتا	الزيت ٪ حجم / وزن	مايرسين ٪ فى الزيت
مصاب	١٤٣٠	١٠٣	٧,٠٩	٦,٧٥	٣,٨	٣٣,٨٧	٥١,٠٧	٠,٧٨	١٩,٥٤
سليم	٢٢٦٦	١٥٦	٩,٣٥	٩,٧٢	٢,٩٣	٣٠,٦٥	٥١,٧٣	٠,٦٨	١٢,٥٧

الفيرويد:

اسم الفيرويد Hop Latent Viroid (HLVd). يتكون الفيرويد من تتابع ٢٥٦ نيوكليتيدة. له عائلين فقط هما **Humulus lupulus** و **H. japonicus**. يمكن اكتشاف الفيرويد فى بقايا النبات بعد أن تكون جميع الأجزاء الهوائية قد ماتت فى الشتاء وذلك باستعمال طريقة Dot - blot hybridization. من السهل كذلك اكتشاف الفيرويد فى نسيج الأجزاء الهوائية فى منتصف الموسم الثانى للنمو ومن الصعب اكتشافه مبكراً فى بداية موسم النمو. يمكن اكتشاف الفيرويد أيضاً بسهولة بين بداية الموسم ومنتصفه ويمكن كذلك اكتشاف الفيرويد فى قواعد السيقان الجديدة ثم بعد ذلك ينتشر كلما تقدمت النباتات فى النمو ويصبح قابل للاكتشاف عندما يصل قريباً من القمة النامية من السيقان فى منتصف الموسم، تقريباً فى الوقت الذى تكون فيه معظم استطالات النمو إنتهت وبدأ الازهار. تكون أعناق الأوراق أكثر الأنسجة كفاءة للإختبار ولإثبات وجود الفيرويد، وذلك لسهولة جمعها ولكبر نصل الورقة وقلة وجود المثبطات بها. إن التهجين فىDot - blot أو فى الموقع قد فشلا فى اكتشاف الفيرويد HLVd فى قمم الأفرع من النباتات النامية على درجات حرارة منخفضة ١٠ْم و ١٥ْم. ولذلك فإن هناك فشل فى إنتاج نباتات خالية من الفيرويد فى مزارع القمة المرستيمية فى المعمل. هذا يؤدى إلى القول بأن هذه الأجزاء تحتوى فيرويد HLVd ولكن بمستوى منخفض جداً بحيث لا يمكن اكتشافه بأى من الطريقتين.

إن هذا الفيرويد ينتشر بشكل كبير جداً فى بريطانيا بحيث أن جميع زراعات حشيشة الدينار تقريباً تصاب به. لقد أجرى إختبار لوجود الفيرويد HLVd بطريقة Nucleic acid hybridization باستعمال ٤٧٦ عينة مأخوذة من زراعات تجارية وإن هذه العينات تمثل نصف إنتاج حشيشة الدينار فى بريطانيا، لقد أمكن اكتشاف الفيرويد فى ١٧ ٪ من العينات وتتراوح نسبة الإصابة فى العينات من صفر٪ إلى ٨٩ ٪.

لقد وجد أن هذا الفيرويد موجود فى جميع الأصناف الحساسة لفطر الذبول **Verticillium** باستثناء صنف واحد اسمه Sunshine وهو صنف قديم ينمو فى مزرعة واحدة فى بريطانيا. كما وجد أن هناك صنفان أقل تحملاً لفطر الذبول، إلا أن الإصابة الفيرويدية فيهما بكمية أقل. ولكن الأصناف التجارية الهامة المتحملة للذبول كلها تكون غير مصابة بالفيرويد HLVd. جدول ٤٤ يبين الأصناف الحساسة لفطر الذبول ونسبة الإصابة الفيرويدية فيها.

ينتقل الفيرويد ميكانيكياً بالحقن بالعصارة وله شكلان دائرى ومستقيم وإن تتابع النيوكليتيدات ٢٥٦ تترتب فى تركيب ثانوى، وفيه منطقة مركزية محفوظة مثل بقية الفيرويدات ولكن ليس فيه ما يسمى Viroid - specif oligo A فى الجزء الأيمن العلوى فى شكل الجزئ شبه العصوى.

جدول ٤٤: الإصابة الفيرويدية فى مخاريط حشيشة الدينار المأخوذة من أصناف حساسة لذبول الفيرتسليم وغير حساسة. يلاحظ أن الجدول قسمين يمينى ويسارى.

الصنف (حساس) غير متحمل للذبول	عدد النباتات المختبرة	عدد النباتات المصابة	٪ إصابة	٪ إصابة	عدد النباتات المصابة	عدد النباتات المختبرة	الصنف متحمل للذبول
Fuggle	٧٩	٧	٩	١٢	١	٨	Bramling cross
Goldings	٤٦	٢٠	٤٣	٨	١	١٢	Progress
Omega	٢٨	٢٥	٨٩	صفر	صفر	١٦	WGV
Sunshine	١	صفر	صفر	صفر	صفر	٨٢	Wye Target
wye challenger	٧٨	١١	١٤	صفر	صفر	٤٥	Yeoman
wye North down	٧١	١١	١٥	٥٠	١	٢	EMY
Zenith	٨	٥	٦٢				

٦ ـ فيرويدات الطماطم

Tomato Viroids

أ ـ مرض النبات الذكرى فى الطماطم

Tomato Planta Macho Disease

مقدمة :

كان أول وصف لهذا المرض فى المكسيك سنة ١٩٧٤ وذلك بواسطة Belalcazar & Galindo. ونتيجة أبحاثهما المستمرة على هذا المرض ذكرا أنه يتسبب عن عامل معدى سهل الانتقال ميكانيكياً ويصعب إنتقاله بالوسائل الأخرى. إن هذا المرض ينتشر فى الحقل عن طريق احتكاك المجموع الخضرى للنباتات المريضة مع المجموع الخضرى للنباتات السليمة وبالأيدى والأدوات الزراعية الملوثة. أجريت تجارب عديدة لمعرفة المسبب ومن هذه التجارب معاملة العصارة المستخلصة من النباتات المريضة بطرق الكشف والتحاليل المختلفة، تبين أن هناك أجزاء صغيرة جداً ومعدية موجودة فى مستخلص الأوراق المريضة وبناءً على هذه النتائج إعتبر المرض بأنه يتسبب عن فيرس. باستمرار الأبحاث أحاطت الشكوك بهذه النتائج مما حدى بالعالم Galindo ومرافقه أن يستمرا فى البحث وخاصة باتجاه الفيرويد لأن علم الفيرويدات كان قد نشأ علماً شاباً يافعاً وبدأت الأبحاث تتسابق إليه. وهكذا استطاع الباحثان أن يثبتا بأن الأجزاء المعدية ليست فيرس وذلك بالاعتماد على الميكروسكوب الالكترونى والآلات المبعثرة للضوء وغيرها. وعندما حضرا حمض نووى من الحزم المبعثرة للضوء وإجراء فصل للأحماض النووية Fractionated

وذلك بالمعاملة بكلوريد الليثيوم وجدا أن هناك جزئ عال الشدة فى العدوى فى محلول كلوريد الليثيوم LiCl - soluble fraction وإفترضا أن هذه الأجزاء ليست فيرس وذلك بسبب أن الأحماض النووية فيها كانت ذات وزن جزيئى منخفض نسبياً. لقد تأكد العالمان أن المسبب فيرويد وليس فيرس وقررا أن مرض النبات الذكرى فى الطماطم Tomato Planta Macho Disease يتسبب عن فيرويد وليس عن فيرس. كذلك فإن المسبب الفيرويدى لهذا المرض يمكن تأكيده على أساس الأعراض التى تظهر على العائل والتى تشبه تلك الأعراض المتكونة على الطماطم المصابة بمرض Tomato Bunchy Top Disease، وكذلك يشبه الأعراض المتكونة على الطماطم نتيجة الإصابة بفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وكذلك يشبه الأعراض المتسببة على الطماطم من الإصابة بفيرويد اكسوكورتز الحمضيات وبالتالى تأكد أن مرض النبات الذكرى فى الطماطم يتسبب عن فيرويد.

الأعراض:

عرف هذا المرض فى المكسيك وهو يهاجم الطماطم **Lycopersicon esculentum** المزروعة فى جميع ولايات المكسيك وخاصة فى منطقة Cuahutla المشهورة بزراعة الطماطم وخاصة للتصدير. يعرف المرض فى تلك المنطقة باللهجة المحلية باسم (Planta Macho) يعنى النبات الذكر وذلك بسبب أن النباتات التى تصاب بالمرض لا تنتج ثمار تسوق، فى بعض السنوات يسبب المرض خسائر كبيرة وأحياناً يسبب فقد كامل فى المحصول.

النباتات المصابة تعانى من التقزم الشديد وتتدلى الأوراق والوريقات ويأخذ النبات المظهر المتهدل وكأنه مرشوش بمبيدات الحشائش عريضة الأوراق أو كأنه يعانى من العطش الشديد (شكل ٦٩). الأوراق المتقدمة فى السن تأخذ اللون الأصفر ثم تجف وتسقط، تصبح أنصال الوريقات متجعدة وهشة وسريعة الانكسار. تحت الظروف المثلى المناسبة للمرض يمكن أن يتكشف نكروزز فى عروق الأوراق والساق.

أهم مظهر يميز هذا المرض هو أن النباتات المصابة تنتج كثيراً من الأزهار والثمار أكثر من النباتات السليمة، إلا أن هذه الثمار تبقى صغيرة جداً لا يزيد حجمها عن حجم البلية (marlbes) وليس لها أية قيمة تسويقية أو إقتصادية.



شكل رقم ٦٩ :

أعراض الإصابة بمرض فيرويد النبات الذكرى فى الطماطم على المجموع الخضرى.

A: أعراض شديدة   B: أعراض متوسطة

المسبب :

يتسبب مرض النبات الذكرى فى الطماطم عن فيرويد اسمه فيرويد النبات الذكرى فى الطماطم Tomato Planta Macho Viroid. ويكتب باختصار (TPMVd). يتكون هذا الفيرويد من ٣٦٠ نيوكليتيدة. عند تحضير معلقات لمستخلصات النباتات المصابة بالمرض وحقنها فى البادرات السليمة، تبين أن

الأعراض تبدأ فى الظهور بعد ٢١ يوم من الحقن وتزداد أكثر إبتداءً من ٢٦ يوم بعد الحقن. ولقد وجد أن هذا الفيرويد إذا حضن مع RNase يفقد حيويته نهائياً أما إذا حضن مع DNase فلا يتأثر بذلك (مثل بقية الفيرويدات) ولقد وجد أن سرعته فى الهجرة الكهربائية مشابهة لسرعة فيرويد PSTVd، واعتماداً على هذه الصفة برز سؤال أمام جميع العاملين على هذا الفيرويد هو هل هذا الفيرويد سلالة من سلالات PSTVd أم لا؟؟. عندئذ إتجهت الأبحاث لتحديد العلاقة بين فيرويد النبات الذكر فى الطماطم TPMVd وفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd. وباستعمال الطرق الحيوية وطرق التحليل الكيميائية مثل Finger prints تبين أن فيرويد TPMVd هو فيرويد منفصل وليس سلالة شديدة كما كان يقال من سلالات PSTVd وذلك اعتماداً على: ـ

١ ـ لقد تبين أن هناك أنواعاً كثيرة من النباتات مقاومة للإصابة بفيرويد TPMVd ولكنها قابلة للإصابة بالفيرويد PSTVd.

٢ ـ هناك أنواع من النباتات العائل يستطيع الفيرويدان أن يتكاثرا فيها ولكن PSTVd يحدث أعراض فى هذه العوائل فى حين أن TPMVd لا يسبب فيها ظهور أية أعراض.

٣ ـ وجد أن هناك أنواع نباتية مشخصة أخرى لهذا الفيرويد TPMVd منها نبات **Gynura aurantica**. فمن المعروف أن فيرويد PSTVd وفيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd يصيبان هذا النبات ويتكاثران فيه (تتناسخ) وتظهر عليه أعراض مميزة، ولكن هذا النبات عند حقنه بالفيرويدTPMVd فإن هذا الفيرويد يتناسخ فى النبات (يتكاثر) وذلك بعد ٣ أسابيع من الحقن، ولكن هذا النبات لا يظهر عليه أعراض إصابة بالفيرويد TPMVd ويبقى Symptomless.

٤ ـ كذلك فإن الفيرويد TPMVd والفيرويد PSTVd تتشارك فى كثير من العوائل ولكنهما يختلفان إختلافاً معنوياً فى تفاعلهما مع هذه العوائل من

حيث القابلية للإصابة والتعبيرات المرضية. فوجد أن كل من Gomphrena globosa ، Datrura stramonium و Nicotiana - tabacum ، هذه الثلاثة عوائل مناسبة PSTVd للفيرويد ويتكاثر فيها (يتناسخ) ولكنها لا تدعم الفيرويد TPMVd وتساعده على التناسخ (التكاثر) أما العوائل:

1 - Nicotiana glutinosa

2 - Solanum melongena

3 - Solanum tuberosum

هى عوائل للفيرويدين ولكنها تصاب فقط بفيرويد الدرنة المغزلية PSTVd وتظهر عليها أعراض مرضية ولا يظهر عليهـا أعـراض مرضية إذا أصيبت بالفيرويد TPMVd.

هذه المميزات أكدت للباحثين أن فيرويد TPMVd هو فيرويد منفصل وليس سلالة شديدة من سلالات فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd.

إنتشار الفيرويد TPMVd فى النباتات المصابة:

إن جدول ٤٥ يبين أن الفيرويد TPMVd أمكن اكتشافه فى جميع أجزاء نباتات الطماطم المصابة. أما الأوراق الناضجة التى لم يظهر عليها أعراض وجدت باستمرار تحتوى كميات أقل مما هو موجود فى الأوراق الصغيرة المظهرة للأعراض. وجدت أكبر كمية من الفيرويد TPMVd فى السيقان والجذور. أما جدول ٤٦ يبين أن الفيرويد متواجد فى جميع الأجزاء تحت الخلوية فى النبات باستثناء ال Postribosomal ووجد أن خلايا الورقة فيها مستويات عالية من الفيرويد موجودة فى أجزاء من الأنوية. أما فى خلايا الساق فإنه يوجد نسبة بسيطة من الفيرويد مرافقة للنوية. معظم الفيرويد متواجد فى الميتوكندريا والأغشية ويوجد بنسبة منخفضة جداً فى البلاستيدات الخضراء والرايبوسومات.

الوقاية بالتضاد Cross - Protection :

كما هو معروف فإن إصابة نباتات الطماطم بالسلالة المعتدلة من فيرويد PSTVd يقيها من إظهار الأعراض (التعبيرات المرضية) عند حدوث إصابة ثانية بالسلالة الشديدة من PSTVd أو الإصابة بفيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd. إعتماداً على ذلك إتجهت الأبحاث لمعرف فيما إذا كانت إصابة نباتات الطماطم بالسلالة المعتدلة من PSTVd يمكن أن تحفظ النباتات من الإصابة أو إظهار التعبيرات المرضية عند حقنها بالفيرويد TPMVd بعد مدة من حقنها بالسلالة المعتدلة من الفيرويد PSTVd.

جدول ٤٥ : التركيز النسبى لفيرويد TPMVd فى أجزاء مختلفة من نباتات الطماطم.

جزء النبات	الفهرسة الحيوية	
	تجربة أولى	تجربة ثانية
جذر	٤٤	٥٩
ساق	٦٥	٤٨
الورقة الأولى والثانية غير مظهرة أعراض	٤٠	٤٥
الورقة الثالثة والرابعة مظهرة أعراض	٥٣	٥٨

ملاحظات:

التجربة الأولى: كانت درجة الحرارة فى الصوبا الزجاجية منخفضة وكانت الأعراض متوسطة.
التجربة الثانية: كانت درجة الحرارة فى الصوبا الزجاجية ٢٩°م والأعراض شديدة.
كانت تستعمل أربعة تخفيفات للفيرويد وهى ١ ـ بدون تخفيف ٢ ـ تخفيف ١ : ١٠، ٣ ـ تخفيف ١ : ١٠٠ أو تخفيف ١ : ١٠٠٠، ٤ ـ تخفيف ١ : ١٠٠٠٠
كانت الفهرسة الحيوية تجرى كما فى بقية أنواع التجارب بدون تمييز.
كانت تحقن النباتات فى طور الفلقات بمستخلص من نباتات مصابة بالفيريد ثم توضع فى الصوبا الزجاجية حتى تصل طول أربعة ورقات ثم يؤخذ منها المستخلص ويقدر فيه الفيرويد.

جدول ٤٦ : توزيع الفيرويد TPMVd فى الأجزاء تحت الخلوية فى ورقة الطماطم ونسيج الساق.

جزء الخلية المختبر	الفهرسة الحيوية	
	الساق	الأوراق
النواة	٦	٢٦
البلاستيدات الخضراء	١٤	١٨
الميتوكندريا	١٩	٩
الأغشية الخلوية	١٨	٢٤
الرايبوسومز	١٢	١٩
بوست رايبوسومال	صفر	صفر

ملاحظات:

كانت تجرى عملية الفهرسة الحيوية كما فى أى تجربة أخرى.

الأجزاء تحت الخلوية تؤخذ من النباتات المظهرة الأعراض النموذجية.

أجريت تجارب على ثلاثة مجموعات من بادرات الطماطم كل مجموعة فيها أربعة بادرات، حقنت بالسلالة المعتدلة من الفيرويد PSTVd ثم بعد ذلك حقنت بالفيرويد المتحدى TPMVd بعد ٥، ١١، ١٧ يوم. ثم حقنت ثلاثة مجموعات أخرى بالفيرويد TPMVd لوحده أيضاً على فترات ٥، ١١، ١٧ يوم وذلك لمقارنة الأعراض وتأثيرات النمو على كل فيرويد. ثم حقنت ثلاثة مجموعات من بادرات الطماطم بالسلالة المعتدلة من PSTVd لوحدها.

يبين جدول ٤٧ أن النباتات المصابة بالسلالة المعتدلة من فيرويد PSTVd لوحدها لها تأثير قليل على نمو النباتات وتؤدى إلى إصابة متوسطة، بينما الإصابة بالفيرويد TPMVd لوحده يؤدى إلى خفض شديد فى طول النباتات ويسبب أعراض شديدة.

عندما حقنت النباتات بالفيرويد المتحدى TPMVd بعد خمسة أيام من الحقن بالسلالة المعتدلة من PSTVd فإن التقزم الملاحظ فى النباتات قد إنخفض قليلاً، بمـرور ١٦ ـ ٤٠ يـوم بعد الحقـن الأول فإن الأعراض كانت أقل شدة إلى حد ما.

عندما حقنت النباتات بالفيرويد المتحدى TPMVd بعد ١١ و ١٧ يوم من الحقن بالسلالة المعتدلة من فيرويد PSTVd لم يلاحظ تغيرات معنوية فى النمو بين النباتات المحقونة بالفيرودين وبين تلك النباتات المحقونة بالفيرويد TPMVd لوحده وذلك بسبب أن موعد الحقن متأخر نوعاً ما وأن النباتات أصبحت أكبر عند حقنها بالفيرويد TPMVd وبالتالى فإن التأثير على النمو إنخفض كثيراً بالمقارنة فى التجربة التى فيها تم الحقن بالمتحدى بعد خمسة أيام. عند المقارنة مع الكنترول كان هناك خفض قليل فى شدة الأعراض لوحظ ثانية فى النباتات المحقونة بالفيرودين، هذا لوحظ بعد ٩، ٤٠ يوماً بعد الحقن الأول فى الاختبار مع المتحدى على يوم ١١ ولكن فقط ٤٠ يوم بعد الحقن الأول فى الاختبار مع المحتدى على يوم ١٧.

ويمكن القول باختصار أن جميع الإختبارات تدل على أنه، بغض النظر عن مدة الزمن التى تفصل بين حقن النباتات بالسلالة المعتدلة من PSTVd والفيرويد المتحدى TPMVd، يحدث هناك تداخل بسيط فى التعبيرات الكاملة لمرض النبات الذكرى فى الطماطم تحدث فى النباتات المحقونة بالفيرودين. هذا التداخل كان بسيطاً بحيث لا ينظر إليه وكأنه ظاهرة وقاية بالتضاد cross - protection. هذا يتأكد بملاحظة أن النباتات المحقونة بالفيرودين، فإن أعراض مرض النبات الذكرى تظهر باستمرار مبكراً وكانت بشكل أولى أكثر شدة فى النباتات الكنترول التى حقنت بالفيرويد TPMVd فى نفس الوقت الذى حقن فيه الفيرويد PSTVd. قد يمكن تفسير ذلك بأنه نوع من ال Synergistic أكثر منه Antagonistic بين الكائنين الممرضين.

جدول ٤٧ : تأثير إصابة نباتات الطماطم بالسلالة المعتدلة من الفيرويد PSTVd على التعبيرات المرضية للإصابة بالفيرويد TPMVd.

نظام الحقن (التجربة)	طول النبات سم بعد يوم			كثافة الأعراض على يوم			
	١٦	٢٩	٤٠	١٣	١٦	٢٩	٤٠
١ ـ بداية الحقن							
أ ـ سلالة فيرويد PSTVd المعتدلة لوحدها	١٦	٢٧	٣٣	+	++	++	++
ب ـ فيرويد TPMVd لوحده	١٠	١٢	١٣	+++	+++	++++	++++
جـ ـ كنترول	١٨	٢٩	٣٥	—	—	—	—
٢ ـ حقن المتحدى بعد خمسة أيام							
أ ـ PSTVd - m / TPMVd	١٣	١٤	١٦	++	++	+++	+++
ب ـ فيرويد TPMVd لوحده	١١	١١	١٣	+	+++	++++	++++
جـ ـ كنترول	١٨	٣٢	٣٧	—	—	—	—
٣ ـ حقن المتحدى بعد ١١ يوم							
أ ـ PSTVd - m / TPMVd	١٦	٢٣	٢٦	—	++	++	++
ب ـ فيرويد TPMVd لوحده	١٨	٢٤	٢٦	—	—	+++	+++
جـ ـ كنترول	٢٥	٣٧	٤١	—	—	—	—
٤ ـ حقن المتحدى بعد ١٧ يوم							
أ ـ PSTVd - m / TPMVd	١٧	٢٨	٣١	?	?	++	++
ب ـ فيرويد TPMVd لوحده	١٨	٣٠	٣٠	?	?	—	+++
جـ ـ كنترول	٣٠	٤٢	٤٦	—	—	—	—

ملاحظات:

PSTVd - m تعنى سلالة فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس المعتدلة.

ـــ: لا يوجد أعراض، ?? لم يجرى لها إختبار، (+) أعراض بسيطة (++) أعراض متوسطة، (+++) أعراض شديدة، (++++) أعراض شديدة جداً. كان يستعمل متوسط طول أربعة نباتات.

نباتات الكنترول التى لم تحقن بأى من الفيرويدين لم تظهر عليها أعراض لأنها سليمة.

العوائل الطبيعية للفيرويد:

اجريت تجربة لتحديد العوائل الطبيعية للفيرويد، جمعت بذور ٥٣ نوع نباتى تمثل ١٥ عائلة نباتية توجد بالقرب من مزارع الطماطم فى المكسيك. حقنت البادرات الناتجة من هذا البذور ميكانيكياً بالفيرويد TPMVd. كانت النتيجة أن أصيب ١٣ نوع من النباتات كلها تتبع العائلة الباذنجانية. وجد أن ثمانية أنواع من هذه الثلاثة عشر تصاب طبيعياً بالفيرويد كان أهمها **Solanum torvum** وإن شدة الأعراض تتراوح من إصابة بسيطة جداً كما فى كل من **Solanum nigrescens** و **Physalis phyladelphica** إلى إصابة شديدة جداً كـما فى **Lycopersicon esculentum**. وجد أن نسبة تركيز الفيرويد فى جميع العوائل الطبيعية تكون عالية فى فترة الخريف بنسبة ١٤,٥٪ أكثر منها فى الربيع والصيف حيث تكون النسبة ٤,٠٪. بعد أن عرف بأن الفيرويد ينتشر فى ١٩ ولاية فى المكسيك درس التوزيع الجغرافى لهذا المرض وتأثير البيئة فى ذلك فوجد أن الخط الحرارى (الذى يحدد درجات الحرارة) الذى يحدد ٢٢°م هو الحدود الفاصلة بين المناطق التى يوجد فيها الفيرويد فى الزراعات البرية لنباتات العائلة الباذنجانية والمنطقة التى لا يوجد فيها الفيرويد، على هذه النباتات ووجد أنه ينتشر فى مقاطعة Tepalcingo بنسبة ٣٢,٥٪ فى نباتات الطماطم. بناءً على هذه النتائج إتجه البحث لمعرفة العامل الناقل للفيرويد والذى يجب أن يتوفر فى الشتاء والخريف ولا يظهر فى الربيع والصيف.

إنتقال الفيرويد:

سبق وأن ذكرنا أن فيرويد TPMVd ينتقل ميكانيكياً بسهولة سواء بالاحتكاك أو بالأدوات الزراعية الملوثة أو أثناء إجراء العمليات الزراعية والملامسة بالأيدى الملوثة. إن دراسة إنتشار الفيرويد والظروف الحرارية التى تحيط بانتشاره جعلت الباحثين لا يقفوا مكتوفى الأيدى ويكتفوا بالقول بأن الفيرويد ينتقل ميكانيكياً. إستمرت الأبحاث المضنية أربع سنوات على هذا الفيرويد لمعرفة طرق إنتقاله، أعطت هذه الأبحاث نتائج مثمرة وذلك باكتشاف ناقل حشرى ولتأكيد هذا استمر البحث

على هذا الناقل مدة ستة شهور بعد ذلك صدر القرار النهائى وهو أن حشرة المن Myzus Persicae هى الناقل النشيط لهذا الفيرويد. إن حشرة المن المذكورة تتجمع على نباتات الفاسيالز من العائلة الباذنجانية Physalis aff foetens وهو نبات برى عائل للفيرويد وأن حشرة المن تعيش على هذا النبات وبالتالى تنقل الفيرويد من العائل البرى إلى النباتات المزروعة. لقد وجد أيضاً أن جميع أطوار الحشرة قادرة على أن تنقل هذا الفيرويد. ولقد وجد أيضاً أن هذا العائل يؤثر على درجة النقل بحشرة المن عندما يستعمل كمصدر للفيرويد.

إن نبات Physalis aff foetens يلائم إنتقال الفيرويد بنسبة ٩٧٪ بينما نباتات الطماطم لا تساهم فى نقل الفيرويد إلا بنسبة ٣٣٪. وجد أن الفيرويد يبقى فى الحشرة لمدة ٢٤ ساعة بعد اكتسابها له. يبدو أن الحشرة تتكاثر على سبعة أنواع من النباتات والتى هى أيضاً عوائل للفيرويد.إن نبات Solanum rostratum هو أكثر الأنواع مناسبة لتكاثر الحشرة وبالتالى لإنتشار الفيرويد. أما نبات الطماطم فهو أقل الأنواع ملائمة لتكاثر الحشرة الناقلة. إن الحشرة تزداد أعدادها إلى أقصى حد فى شهر يناير وتصل أدنى حد من التكاثر فى شهر مايو وهذا ما يتوافق مع إنتشار الفيرويد على نباتات الطماطم ويمكن اعتماداً على ذلك وضع برنامج جيد لمقاومة الحشرة وبالتالى مقاومة الفيرويد بطريق غير مباشر.

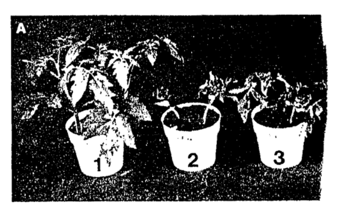
ب ـ مرض تقزم قمة الطماطم

Tomato Apical Stunt Disease

يتسبب هذا المرض عن فيرويد تقزم قمة الطماطم Tomato Apical Stunt Viroid (TASVd). لهذا الفيرويد سلالتين السلالة الأولى اسمها سلالة ساحل العاج وتتكون من ٣٦٠ نيوكليتيدة والثانية سلالة إندونيسيا وتتكون من ٣٦٣ نيوكليتيدة. تبلغ نسبة تماثل التتابع فى هذا الفيرويد ٩١٪. يسبب أعراض شديدة على الطماطم صنف Rutgers.

تظهر الأعراض على شكل تقزم فى قمة النبات بحيث تقصر السلاميات وتصغر الأوراق (شكل ٧٠). تصفر الأوراق السفلية وتسقط تبقى النباتات ضعيفة وينخفض الإنتاج كثيراً. ينتقل الفيرويد ميكانيكياً بسهولة عن طريق تلوث الأيدى والأدوات الزراعية وأثناء العمليات الزراعية.

هناك تجارب كثيرة على هذا الفيرويد بحيث يتكون فيرويد جديد مركب من جزيئين جزء من فيرويد تقزم القمة فى الطماطم والجزء الثانى من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس أو فيرويد اكسوكورتز الحمضيات. وبالفعل أمكن تركيب فيرويد جديد فيه صفات الفيرودين وهذه أبحاث كثيرة لا مجال لذكرها هنا.



شكل رقم ٧٠:

أعراض الإصابة بفيرويد تقزم القمة فى الطماطم.

١ ـ كنترول ٢ ـ الإصابة بالعزلة الأندونيسية ٣ ـ الإصابة بعزلة ساحل العاج.

جـ ـ مرض القمة الشجيرية في الطماطم

Bunchy Top Disease of Tomato

مقدمة:

كان أول وصف لهذا المرض فى جنوب أفريقيا وذلك سنة ١٩٣١ من قبل العالم McClean. إستمرت أبحاث هذا العالم على مرض القمة الشجيرية فى

الطماطم لغاية سنة ١٩٣٥ وذكر بأن هذا المرض ينتشر فى جنوب أفريقيا ويسبب خسائر كبيرة فى محصول الطماطم ونشر أول بحث عن هذا المرض فى مجلة اسمها South African Department of Agriculture Science Bulletin 139. ذكرت الأعراض ونسبة الإصابة والخسائر إلا أن مسبب المرض إفترض على أنه فيرس، مع ذلك فإن طرق الانتقال وصفات المسبب لم توضح فى تلك الأبحاث وبقيت الشكوك محيطة بهذا المسبب المرضى. فى سنة ١٩٧٩ ذكر هذا المرض فى الهند وأجريت عليه تجارب عديدة إلا أنها لم تحدد المسبب ولا طريقة الانتقال. فى سنة ١٩٨١ كان هناك وصف لهذا المرض فى المجلة العلمية الأكاديمية فى غرب أفريقيا. إن مرض القمة الشجيرية فى الطماطم ينتشر فى الهند بشكل كبير ويسبب خسائر كبيرة ولذلك يسمى باسم مرض القمة الشجيرية الهندى فى الطماطم Indian Bunchy Top Disease of Tomato. أجريت تجارب عديدة على مسبب المرض فى الهند وإتجهت هذه الأبحاث إلى الفيرويد واستبعدت الفيرس. لقد عزل الفيرويد من نباتات الطماطم **Lycopersicon esculentum** المصابة بمرض التقزم الشجيرى الهندى. باستعمال طرق الإختبارات Blot hybridization بالمنقب cRNA المعلم بالفسفور المشع ٣٢ المخصص لاكتشاف الفيرويدات المختلفة، وجد أن هذا الفيرويد الهندى شديد التقارب والعلاقة مع فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd. ولقد أظهر تحديد التتابع أن الفيرويد يتكون من ٣٧٢ نيوكليتيدة ولقد أعطى اسم فيرويد اكسوكورتز الحمضيات سلالة الطماطم CEVd - t وهذه السلالة تختلف عن السلالات الاسترالية للفيرويد CEVd بستة وثلاثين نيوكليتيدة عن السلالة A و ٤٧ نيوكليتيدة عن السلالة B ويختلف عن سلالة العنب الأسبانية بتغير ٥٢ نيوكليتيدة. وبتحليل النشوء الوراثى لهذا الفيرويد تأكد بأنه قريب الصلة مع فيرويد CEVd فى جميع تركيب النطاقات باستثناء نطاق المرضية والنطاقات الطرفية اليسارية والتى هى مطابقة تماماً لما هو فى فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وفيرويد تقزم القمة فى الطماطم.

الأعراض:

يصيب هذا المرض نبات الطماطم **Lycopersicon esculentum** وتظهر الأعراض على شكل توالد مستمر وغزير من النموات الحديثة فى قمة النبات مصحوباً بتقزم هذه النموات الحديثة وتدليها وحدوث تشوهات كثيرة مختلفة فى أنصال الأوراق (الوريقات) ونكروزز فى العروق. تتشابه أعراض هذا المرض مع مرض تقزم القمة فى الطماطم المذكور سابقاً ويصعب التمييز بينهما إلا بالعين الخبيرة حيث أن هذا المرض تكون فيه قمم النباتات أكثر غزارة من المرض الأول وتكون الأوراق الصفراء قليلة فى مرض شجيرة الطماطم الهندى ولكن هذه الأخيرة ليست علامة مميزة دائماً بل قد يحدث العكس عند إختلاف درجات الحرارة عن الظروف المثلى للنبات.

المسبب:

يتسبب مرض القمة الشجيرية الهندى فى الطماطم عن فيرويد هو عبارة عن سلالة من سلالات فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd ويطلق عليه CEVd - t ويتكون هذا الفيرويد من ٣٧٢ نيوكليتيدة تتكون من A ٧٢ و C ١٠٩ و G ١١٣ و U ٧٨ وبذلك تكون محتوياته من G + C تساوى ٥٩,٧٪ وهى قريبة من الفيرويدات النموذجية الأخرى. وأن نسبة G + C إلى نسبة A + U تساوى ١,٤٨ وإن التركيب الثانوى لهذا الفيرويد يتكون من أزواج قواعد عالية ويأخذ ظاهرياً شكل عصوى ثنائى الخيط والذى فيه مناطق حلزونية قصيرة التتابع مع عروات منتفخة داخلية.

بتحليل تتابع تركيب النطاقات الخمسة لهذا الفيرويد ومقارنتها مع الفيرويدات الأخرى والفيروسايدات أعطت النتيجة المذكورة فى جدول ٤٨ . إن المنطقة متغيرة النطاق ونطاقات جانب الطرف الأيمن قريبة الشبه غالباً مع ما هو موجود فى فيرويد

اكسوكورتز الحمضيات CEVd، بينما نطاق المرضية يشبه فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd أما الطرف اليسارى فهو أكثر تشابهاً وقرباً مع فيرويد تقزم قمة الطماطم TASVd.

إن حدود النطاقات لفيرويد القمة الشجيرية الهندى عزلة CEVd - t هى كما يلى: -

١ ـ نطاق الطرف الأيسر من ٣٢٦ إلى ٣٧٢ فى الخيط السفلى ومن ١ إلى ٤٦ فـى الخيـــط العلـوى } ٩٣ نيوكليتيدة

٢ ـ نطاق المرضيــة من ٤٧ إلى ٧٥ فى الخيــط العلـوى ومن ٢٩٤ إلى ٣٢٥ فى الخيط السفلى } ٦١ نيوكليتيدة

٣ ـ المنطقــة المركزيــة المحفوظــة من ٧٦ ـ ١٢٢ فى الخيط العلوى ومن ٢٤٤ إلى ٢٩٣ فى الخيط السفلى } ٩٧ نيوكليتيدة

٤ ـ المنطقة المتغيرة من ١٢٣ إلى ١٥٠ فى الخيط العلوى ومن ٢١٥ إلى ٢٤٣ فى الخيط السفلى } ٥٧ نيوكليتيدة

٥ ـ نطاق الطرف الأيمن من ١٥١ إلى ٢١٤ تأخذ جزء من الخيط العلوى وجزء من الخيط السفلى يتكون من ٦٤ نيوكليتيدة.

المميزات العامة للمسبب:

الصفة الأولى: -

من نتائج الدراسات السابقة تبين أن مرض القمة الشجيرية الهندى فى الطماطم يتسبب عن فيرويد وأن هذا الفيرويد من سلالات الفيرويدات التى تصيب الطماطم

جدول ٤٨ : يبين أعداد النيوكليتيدات المتغيرة فى كل نطاق بالنسبة للفيرويد ١ - CEVd.

الفيرويد وسلالاته	عدد النيوكليتيدات المختلفة الموجودة فى كل نطاق من الفيرويدات عن فيرويد القمة الشجيرية فى الطماطم										
	الطرف اليسار		المرضية		المنطقة المركزية المحفظوة		المنطقة المتغيرة		الطرف اليمين		المجموع
	عدد	٪	عدد	٪	عدد	٪	عدد	٪	عدد	٪	عدد
١ ـ CEVd											
السلالة الاسترالية A	١	٠,٩	١٤	٢٢,٩	صفر	صفر	١٦	٢٨,٠٧	٥	٧,٨١	٣٦
السلالة الاسترالية B	١١	١١,٨	١٥	٢٤,٥٩	٢	٢,٠٦	١٥	٢٦,٣	٤	٦,٢٥	٤٧
السلالة الاسبانية g	١٢	١٢,٩	١٣	٢١,٣١	٣	٣,٠٩	١٦	٢٨,٠٧	٩	١٤,٠٦	٥٣
٢ ـ PSTVd											
السلالة المتوسطة I	٤٣	٤٦,٢٣	١٣	٢١,٣	٥١	٥٢,٥٧	٨٤	١٤٧,٣٦	٤٣	٦٧,١٨	٢٤٤
السلالة المعتدلة M	٤٣	٤٦,٢٣	١٥	٢٥	٥٠	٥١,٥٤	٨٣	١٤٥,٦	٤٣	٦٧,١٨	٢٣٤
السلالة الشديدة S	٤٦	٤٩	١٤	٢٢,٩٥	٥١	٥٢,٥٧	٨٤	١٤٧,٣٦	٤٣	٦٧,١٨	٢٣٨
٣ ـ TASVd											
عزلة أفريقيا	٨	٨,٦	٥٠	٨١,٩٧	١٨	١٨,٥٥	١٠٦	١٨٥,٩٥	٤٩	٧٦,٥٦	٢٣١
عزلة اندونيسيا	١٠	١,٠٧	٤٤	٧٢,٣	٢١	٢١,٦٤	١١٤	٢٠٠	٤٦	٧١,٨٧	٢٣٥
٤ ـ TPMVd	٤٣	٤٦,٢٣	٣٢	٥٢,٤٦	٥٠	٥١,٥٤	١١٤	٢٠٠	٤٧	٧٣,٤٣	٢٨٦

ملاحظات:

محتوى فيرويد١ - CEVd : الطرف اليسار ٩٣، نطاق المرضية ٦١، المنطقة المركزية المحفوظة ٩٧ المنطقة المتغيرة ٥٧، الطرف اليمين ٦٤.

النسبة المئوية الزائدة عن ١٠٠ ٪ تعنى أن نيوكليتيدات الفيرويد المقارن أكثر من نيوكليتيدات ١ - CEVd وكلها مختلفة.

مثل فيرويد تقزم القمة فى الطماطم TASVd أو فيرويد النبات الذكرى فى الطماطم TPMVd ولكنه سلالة مميزة من سلالات فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd ولم يسبق لهذا الفيرويد أو هذا المرض أن وجد مترافقاً مع أمراض أخرى من أمراض الطماطم. لقد ثبتت العلاقة القريبة لهذا الفيرويد مع فيرويد CEVd بواسطة إختبار Blot - hybridization وباستعمال cRNAs متخصصة لاكتشاف عدد كبير من الفيرويدات وأن تحليل التتابع قد أكد بأن هذا الفيرويد هو سلالة منفصلة من CEVd، وأطلق عليه اصطلاح سلالة الطماطم من فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd - t. مع أن فيرويد تقزم قمة الطماطم وفيرويد النبات الذكرى فى الطماطم تسبب أمراض تحدث طبيعياً ومنتشرة فى مناطق كثيرة، إلا أن مرض القمة الشجيرية الهندى هو أول مرض يصيب الطماطم ويتسبب عن فيرويد CEVd.

الصفة الثانية:

إن فيرويد CEVd - t أكثر قرباً وعلاقة مع فيرويد العزلة الاسترالية A، حيث أن هناك إختلاف فى ٣٦ تغير فى النيوكليتيدات، حصل استبدال فى ٢٩، وثلاثة إضافة (ادخال) و وإزالة ٤. أما فى العزلة الاسترالية B هناك إختلاف فى ٤٧ نيوكليتيدة منها ٣٨ إستبدال و ٤ إضافة (ادخال) و ٤ إزالة أما فى سلالة العنب من CEVd فإن لتغير فى ٥٣ نيوكليتيـدة، منها ٤٦ إزالة وإضافة ٢ وخمسة حذف.

كما هو الحال فى عزلة العنب الاسترالية CEVd - g فإن تتابع النيوكليتيدات فى CEVd - t تختلف كثيراً عن السلالات A ، B وهذا الاختلاف أكثر من الاختلافات الموجودة بين B و A نفسها، مما يدل على الانعزال النسبى لكل من CEVd - g و CEVd - t عن بقية سلالات CEVd المعزولة من الحمضيات، وقد يرجع سبب ذلك لإختلاف أصل العائل هذا يعنى العنب والطماطم حيث الاختلاف النباتى بينهما كبير.

الصفة الثالثة:

إن الاختلافات التى تحول CEVd - A إلى CEVd - t موجودة أساساً فى الطرف اليسارى وفى نطاق المرضية والنطاق (المنطقة) المتغير، بينما النطاق المركزى ومنطقة الطرف اليمين لا تخضع أساساً لأى تغيرات. كذلك فإن CEVd - t يشابه أيضاً CEVd - g فى هذه المجالات إلا أن منطقة الطرف اليمين ومنطقة الطرف اليسار تختلف معنوياً عن CEVd - A.

إن تغيير النيوكليتيدات بين سلالات CEVd المؤدية إلى تحورات فى التركيب الثانوى المفترض لنطاق المرضية قد استخدمت من قبل الفيرويد فى تحويرات التعبيرات المرضية على الطماطم. ولقد ثبت أن معظم هذه التغيرات التى تؤدى إلى تركيب ثانوى مختلف فى نطاق المرضية للسلالات المعتدلة (عند مقارنتها مع السلالات الشديدة) تتواجد خارج القلب المركزى والذى هو محفوظ بشدة فى جميع السلالات الشديدة. هذا القلب المركزى يتكون من $A_5 - 6$ تتابع (غالباً فى عروة داخلية) وملاصقة لزوج قواعد السيقان. بفحص القلب المركزى فى CEVd - t تبين أن تركيبه الثانوى نموذجى كما هو فى جميع السلالات الشديدة باستثناء الثمانية قواعد الموجودة فى المنطقة الحلزونية إلى اليمين من تتابع(A) Aligo الموجود فى السلالات الشديدة من CEVd التى تتعوق بواسطة دخول (غرز) خمسة نيوكليتيدات (تؤدى إلى عروة داخلية من ثلاثة مراكز قواعد مزدوجة A - U). إن تخفيض الثبات الحرارى لهذه المنطقة الموضعية لا يؤثر بالضرورة على شدة التعبيرات المرضية. هذا يكون واضحاً أكثر بحقيقة أن القلب المركزى لنطاق المرضية موجود فى كل السلالات الشديدة من الفيرويد CEVd (باستثناء CEVd - t)، تحدث أيضاً فى جميع سلالات PSTVd بغض النظر فيما إذا كانت تحدث أعراض متوسطة أو معتدلة أو شديدة فى الطماطم.

الصفة الرابعة:

إن دراسة نشوء الفيرويدات أجريت مع كل تركيب لكل نطاق بمفرده فى الفيرويدات المختلفة وهذا أدى إلى القول بأن النطاقات المتماثلة فى مختلف الفيرويدات قابلة للتغير وهذا يكون أكثر وضوحاً عن طريق ملاحظة تتابع النيوكليتيدات فى فيرويد Columnea الكامن والذى يتكون من تتابعات سائدة تبين أنها موجودة فى فيرويدات أخرى. ونتيجة معرفة تتابع فيرويد العنب الاسترالى والذى إقترح بأنه نتيجة لإعادة الاتحاد (الارتباط) المتكررة فى RNA. بالمثل يمكن القول بأن الفيرويد CEVd - t هو نتيجة إعادة الاتحاد بين RNA فى فيرويدات مختلفة أو يمكن القول بأن هذا الفيرويد CEVd - t هو حلقة بين فيرويد PSTVd وفيرويد TASVd التى تسبب أعراض مرضية فى الطماطم. أو القول بأنه مركب من جزئين من الفيرويدين الذين يصيبان الطماطم.

٧ - فيرويد الخيار

Cucumber Viroid

مـرض الـثـمـرة الباهتة في الخيـار

Cucumber Pale Fruit Disease

أعراض المرض:

يهاجم هذا المرض نباتات الخيار **Cucumis sativus** تظهر النباتات المصابة متقزمة فيها شفافية عروق وتتجعد الورقة قبل أن تسقط. تصفر الأوراق السفلى وتسقط أحياناً وتجف أحياناً أخرى قبل أن تسقط، يضعف المجموع الخضرى ويضعف نمو النبات وتقل الانتاجية. تصبح الثمار صفراء أو خضراء باهتة وتكون متكرمشة أحياناً وذات شكل غير منتظم يقل الانتاج بنسبة كبيرة، تصبح الثمار غير صالحة للتسويق. يتشابه هذا المرض فى أعراضه مع أعراض كثير من أمراض الفيروسات التى تهاجم الخيار إلا أن المميزة الرئيسية التى تميزه عن الإصابات الفيروسية هو عدم ظهور تلونات أو موزايك فى نصل الورقة باستثناء شفافية العروق. وكذلك لا يتكون زوائد على الثمرة ولا يصبح نسيجها اسفنجياً كما فى بعض الإصابات الفيروسية.

المسبب:

يتسبب هذا المرض عن فيرويد الثمرة الباهتة فى الخـيار Cucmber Pale Fruit Vioid ويكتب باختصار (CPFVd). بقى الاعتقاد سائداً بأن هذا المرض يتسبب عن فيرويد تقزم حشيشة الدينار HSVd حيث أن فيرويد تقزم حشيشة الدينار له

سلالات عديدة ويتراوح عدد النيوكليتيدات فى هذه السلالات من ٢٩٧ إلى ٣٠٣، إلا أن السلالة التى تصيب نبات الخيار طولها ٢٩٧ نيوكليتيدة. ولقد وجد أن فيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار CPFVd يتكون من ٣٠٣ نيوكليتيدة. ولقد أجريت تحاليل عديدة وتجارب تمييز بين هذا الفيرويد وسلالة فيرويد HSVd فأصبح من المؤكد أن هذا الفيرويد CPFVd هو فيرويد منفصل لوحده وليس عزلة من عزلات فيرويد تقزم حشيشة الدينار، إلا أن هناك كثير من المراجع لا تزال تذكر أن فيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار هو عزلة من عزلات فيرويد تقزم حشيشة الدينار.

هناك أسباب أدت إلى الاعتقاد بأن فيرويد CPFVd هو عزلة من عزلات HSVd وهى: -

١ ـ إن بعض عزلات فيرويد HSVd تسبب أعراض على نبات الخيار متماثلة تماماً مع ما يسببه فيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار.

٢ ـ لا يمكن التفريق بين عزلة فيرويد HSVd وفيرويد CPFVd اعتماداً على الأعراض أبدًا.

٣ ـ كلا الفيرويدين له تماثل تتابع عال جداً يصل ٩٥٪ إلا أنه غير متطابق.

٤ ـ العوائل التى تصيبها عزلة HSVd هى نفسها التى يصيبها الفيرويد CPFVd.

معظم الأبحاث أقرت بأن فيرويد CPFVd وفيرويد HSVd كلاهما عامل مسبب لمرض الثمرة الباهتة فى الخيار وهما يوجدان منفصلين فى عوائل نباتية مختلفة مثل **Cucumis sativus** للفيرويد الأول و **Humulus lupulus** للفيرويد الثانى فى مناطق مختلفة. يمكن فصل الفيرودين بطريقة PAGE ووجد أن فيرويد CPFVd أكبر من فيرويد HSVd بحوالى ستة نيوكليتيدات وإن كلا الفيرودين فيه تماثل تتابع عال جداً إلا أنها غير متطابقة. يختلف CPFVd عن الفيرويد HSVd عزلة الخيار فى تتابع النيوكليتيدات على موقع ١٦ والذى يتضمن

تغيير ٨ نيوكليتيدات ودخول ٧ نيوكليتيدات وحذف واحدة من HSVd. كلا الفيرودين فيهما تماثل تتابع ٩٥ ٪. إن فيرويد CPFVd يشكل تركيب شبه عصوى مع عديد من أزواج القواعد وإنه يتماثل مع PSTVd بنسبة ٥٥ ٪ ونفس النسبة مع فيرويد HSVd عزلة الخيار. كذلك فإن تماثل عزلات CPFVd يصل ٩٥ ٪ أما تماثل عزلات HSVd فهو ١٠٠ ٪. كلا الفيرودين يسبب إصابة كامنة فى الطماطم ولا يهاجمان نبات Gynura.

إنتقال الفيرويد:

ينتقل فيرويد CPFVd خلال بذور وحبوب اللقاح فى الطماطم صنفRutgers وتصبح النباتات مصابة جهازياً وتظهر الأعراض على النباتات وينخفض الإنتاج، لكن نباتات الطماطم النامية من بذور مصابة لا يظهر عليها أعراض ولكن يمكن اكتشاف الفيرويد فيها بطريقة electrophoresis على ٥ ٪ بولى أكريلامايد جيل ويكشف عن الفيرويد فى البذور بواسطة Spot hybridization.

يتحرك الشكل الدائرى من الفيرويد فى الهجرة الكهربائية أقل من سرعة فيرويد HSVd عزلة الخيار. أما الشكل المستقيم للفيرويد لم يمكن كشفه بالصبغ فى الجيل ولكن يستدل عليه بالاختبارات الحيوية. يبلغ متوسط طول الشكل الدائرى لفيرويد CPFVd حوالى (٨٢ ∓ ٤,٢) نانوميتر أما طول الشكل الدائرى لفيرويد HSVd عزلة الخيار (٨٣ ∓ ٢,٤) نانوميتر.

المدى العائلى:

وجد أن هناك ١٢ نوعاً من العائلة القرعية من ٢٦ نوع تصاب بفيرويد HSVd عزلة الخيار وتختلف شدة الإصابة حسب نوع النبات المزروع وحسب الصنف وإن العوائل القابلة للإصابة بالفيرويد HSVd عزلة الخيار والتى تظهر أعراض قابلة للتشخيص هى: –

1 - **Benincase hispida**

2 - **Cucumis melo** Var. **acidulus**

3 - **Cucumis melo** Var. **conomon**

4 - **Cucumis melo** Var. **inodolus**

5 - **Cucumis melo** Var. **reticulatus**

6 - **Lagenaria siceraria** Var. **clavata**

7 - **Lagenaria siceraria** Var. **gourda**

8 - **Lagenaria siceraria** Var. **microcarpa**

9 - **Luffa cylindrica**

10 - **Cucurbita moschata**

فيرويد HSVd عزلة الخيار:

كما هو معروف فإن إصابة بادرات الخيار بفيرويد HSVd عزلة الخيار يسبب تقزم ملحوظ وأوراق غائرة العروق مجعدة. نتيجة الإصابة بهذا الفيرويد يحدث نقص فى نسبة منظم النمو أندول أستك أسد فى أول عشرة أيام بعد الحقن وقبل تجعد الورقة ويستمر على الأقل لمدة ٣٠ يوم. كذلك تتأخر الأزهار المؤنثة فى الظهور عن الوقت المعتاد. أما منظم النمو الجبرلك أسد فإن مستوياته لا تتأثر بالإصابة.

درس تأثير عدة مواد كيمياوية على حيوية فيرويد HSVd عزلة الخيار فوجد أن حيوية الفيرويد تزداد بإضافة البنتونايت Bentonite ولكنها تنخفض بإضافة اوكسلات الصودويم و RNA الخميرة. زادت الحيوية قليلاً باستعمال تانك أسد بتركيز ١,٠ ملغ / مللتر وقلت الحيوية أيضاً باستعمال تانك أسد بتركيز ١ ملغ / مللتر. تثبط نشاط الفيرويد كلية باستعمال RNase البنكرياس وكذلك بإضافة Acridine orange وازرق الميثيلين و Toludine blue O عندما يكون الفيرويد تحت الإضاءة العادية أما تحت الظلام فإن الحيوية انخفضت بنسبة أقل. إن تثبيط الحيوية باستعمال Bentonite مع مخلوط الفيرويد يحدث مع الصبغة أما بدون صبغة فتزداد الحيوية.

٨ - فيرويدات كوليومنيا
Columnea Viroids

أ - فيرويد كوليو منيا الكامن
Cloumnea Latent Viroid

مقدمة:

إن نبات Columnea من نباتات الزينة التابعة للعائلة الجسنراسية Gesneriaceae. إن هذا النبات يسمى Epiphytic وهو عبارة عن تحت شجيرات Subshrubs أو أعناب منشأوها جنوب أمريكا وهى تنمو فى سلال معلقة فى الصوبات الزجاجية أو البيوت فى أمريكا الشمالية. يتكاثر هذا النبات أساساً عن طريق العقل المأخوذة من الساق وهى تستطيع أن تحافظ وتديم الفيرويد فيها.

الفيرويد:

إن فيرويد الكوليومنيا الكامن Columnea Latent Viroid (CLVd) يوجد بشكل كامن فى نبات الزينة المسمى Columnea erythrophae والذى ينمو تجارياً. إذا هاجم الفيرويد البطاطس والطماطم فإنه يسبب أعراض شبيهة بأعراض فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس عند مهاجمته للبطاطس. إن تتابع نيوكليتيدات هذا الفيرويد وتركيبه الثانوى المقترح يبين أنه يتكون من RNA أحادى الخيط دائرى يتكون من ٣٧٠ نيوكليتيدة والتى تأخذ التركيب ذو الشكل العصوى بعديد من أزواج القواعد والتى تميز جميع الفيرويـدات المعروفة. إن الحركة فى الهجرة الكهربائية للفيرويد

الدائرى CLVd تحت ظروف غير مدنتــرة تؤدى إلى القول بوجود التركيب الثلاثى.

يحتوى الفيرويد CLVd العديد من تماثل التتابع المشابهة لما فى مجموعة فيرويدات PSTVd ولكنه يحتوى منطقة مركزية محفوظة نموذجية كما هو موجود فى فيرويد تقزم حشيشة الدينار HSVd. كذلك فإن الفيرويد CLVd يشارك فى بعض الصفات الحيوية مع كل من مجموعة الفيرويدات B2 و B3. من المحتمل أن يكون الفيرويد CLVd قد نشأ نتيجة من تداخل وإعادة الاتحاد للحمض RNA بين مجموعة HSVd ومجموعة فيرويدات PSTVd أثناء تكاثرهما فى نفس النبات.

ب - فيرويد نيماتنثص

Nematanthus Viroid

مقدمة:

عزل فيرويد من نباتات زينة اسمها **Nematanthus wettsteinii** هذه النباتات غير مظهرة لأعراض مرضية، وذلك باستعمال طريقة R - PAGE وذلك لتحليل الأحماض النووية منخفضة الوزن الجزيئى. أمكن نقل الحمض النووى إلى الطماطم وثلاثة أصناف مزروعة من البطاطس ونباتات **Scopolia sinensis** بالحقن الميكانيكى أو بالتطعيم. إن نباتات العائلة الباذنجانية المحقونة يتكشف عليها أعراض مشابهة لتلك المتسببة عن فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd. إن فيرويد نيماتنثص يتكون من ٣٧٢ نيوكليتيدة، تركيبها كالآتى: - ٢١٤ من G + C و ١٥٨ من A + U وأن نسبة G + C / A + U تساوى ١,٣٥ . إن واحدة من سبعة كلونات cDNA أظهرت إختلاف فى التتابع G to A على موقع ٧٣. إن أكثر التراكيب الثانوية ثباتاً لهذا الفيرويد هى تلك التى تمتلك ازواج قواعد G : C ٧٨ و A : U ٣٧ و G : U ١١ مع أقل طاقة حرة من (456.9 KJ -). إن هذا الفيرويد متقارب تماماً مع فيرويد كوليومنيا الكامن الذى يتكون من ٣٧٠ نيوكليتيدة. إن فيرويد نيماتنثص

يمتلك مناطق ذات تتابع متماثل ١٠٠ ٪ مع ستة فيرويدات تتبع مجموعة PSTVd ومجموعة فيرويد ندب الجلد فى التفاح ASSVd. كذلك فإن الفيرويد يتناسخ فى نباتات الطماطم عندما تحقن مع PSTVd. كذلك فإنه أمكن وقاية نباتات الطماطم بالوقاية بالتضاد ضد فيرويد PSTVd عندما حقنت مقدماً بالفيرويد نيماتنتس.

الأعراض:

يتكشف على النباتات المصابة بهذا الفيرويد أعراض تتميز بأنها ميكروسكوبية. فى الطماطم تظهر الأعراض على شكل صغر الأوراق بحيث تكون أصغر من الوضع الطبيعى والتى تتقزم مجتمعة فى قمة النبات. أحياناً فإن العروق الوسطية من الأوراق يتكشف عليها خطوط ميتة ومتحللة Necrotic streaks. هناك فرق معنوى كبير بين طول النباتات المصابة والسليمة حيث تكون النباتات المصابة متقزمة بشكل واضح.

أما فى نباتات **S. sinensis** يتكشف عليها بقع متحللة جهازية وتخطيطات بالإضافة إلى أن الورقة تصل طور الشيخوخة قبل أن تنضج. إن هذه الأعراض مماثلة جداً لتلك المحدثة بواسطة الفيرويد PSTVd فى العوائل الخاصة به. إن إصابة نباتات الطماطم بالفيرويد CLVd - N يظهر عليها أعراض معتدلة تظهر بعد ٣ ـ ٤ أسابيع ويتكشف أوراق أصغر من الأوراق الطبيعية ويحدث تقزم فى النبات.

الفيرويد:

لقد وجد أن الفيرويد المستخلص من نبات **Columnea** يستطيع أن يصيب نباتات العائلة الباذنجانية ومن ضمنها البطاطس. كما أن نبات **Columnea** يستطيع أن يحافظ ويديم الفيرويد فيه (يجعله مستمراً فيه) بطريقة غير محددة وأحياناً ينقله. فى الحصر المحدود لنباتات الزينة فى أمريكا اكتشف إصابة بالفيرويد غير مظهرة أعراض فى نبات الزهرة الجرابية **Nematanthus (Hypocryta) wettsteinii**. إن هذا الفيرويد يتكون من ٣٧٢ نيوكليتيدة وفيه ٩٧,٨ ٪ تماثل مع الفيرويد الكامن

لنبات Columnea والذى يكتب CLVd. ولقد وجد أنه كما فى CLVd فإن الفيرويد المأخوذ من N. wettsteinii يصيب نباتات العائلة الباذنجانية ومن ضمنها البطاطس. وبسبب قربه التام والعلاقة الوراثية مع CLVd فإن هذا الفيرويد إعتبر سلالة متميزة من CLVd تحدث طبيعياً فى النبات من أنواع Nematanthus وأعطى اسم CLVd - N.

انتقال الفيرويد:

أخذت نباتات طماطم ونباتات S. sinensis ونباتات بطاطس وحقنت ميكانيكياً بمستخلصات الحمض النووى المأخوذ من نباتات مريضة من N. wettisteinii فكانت نسبة الإصابة ٣٠ نبات من بين ٩٣ نبات محقون. أما بالتطعيم فأصيبت ٢٠ بادرة من ٦٣ نبات مطعوم. أما بواسطة التجريح فأصيب ٣ نباتات من ١٥ نبات معامل. يحدث هذا الفيرويد أعراض على نباتات العائلة الباذنجانية تشبه الأعراض الناتجة عن PSTVd. لم يثبت لغاية الآن (١٩٩٢) إنتقال الفيرويد بالبذور سواء فى البطاطس أو الطماطم أو كولويومنيا.

تداخل الفيرويد والوقاية بالتضاد:

عندما حقنت نباتات الطماطم بالفيرويد PSTVd السلالة المعتدلة وكذلك بالفيرويد CLVd - N أعطت نفس الأعراض، وبالتالى فإن تأخير ظهور الأعراض لايمكن استعماله لتحديد تداخل الفيرويدات. إن اكتشاف وتقدير كمية شرائح RNA الفيرويدى بواسطة R - PAGE استعملت لدراسة تفاعلات الفيرويد فى الإصابات المختلطة. النباتات المحقونة بلقاح مركب يحتوى كلا الفيرويدين تصبح مصابة بكلا الفيرويدين بغض النظر عن مرحلة النمو وقت الحقن.

فى دراسات الوقاية بالتضاد، عندما حقنت النباتات بفيرويد PSTVd السلالة المعتدلة ثم بعد ذلك حقنت بالمتحدى الفيرويد CLVd - N فإن الأخير قد اكتشف

بعد ثمانية أسابيع من الحقن وبالمقابل عندما حقنت النباتات بالفيرويد CLVd - N وبعد ذلك حقنت بالسلالة المعتدلة من PSTVd فإن هذه الأخيرة لم تكتشف بعد ثمانية أسابيع ولكنها احتاجت إلى أكثر من ذلك بكثير مما يدل على حدوث وقاية بالتضاد لنباتات الطماطم من الإصابة بالسلالة المعتدلة من الفيرويد PSTVd. وهذا يعنى أن الحقن السابق بالفيرويد CLVd - N تمنع السلالة المعتدلة PSTVd من أن تثبت أقدامها فى النبات.

تماثل تتابع الفيرويد مع الفيرويدات الأخرى:

عند مقارنة تتابع الفيرويد CLVd - N مع الفيرويدات الأخرى تبين أن هناك قرابة وثيقة جداً مع الفيرويد CLVd الذى يتكون من ٣٧٠ نيوكليتيدة. من بين النيوكليتيدات ال ٣٧٢ التى يتكون منها CLVd - N فإن هناك ٣٦٢ نيوكليتيدة متوافقة مع تتابعات موجودة فى CLVd. كما أن CLVd - N يختلف عن تتابعات CLVd فى نطلق P من الخيط السفلى حيث UUC تنقلب إلى UGUCU أما فى الخيط العلوى فإن نطاق V يحدث فيه إنقلاب من UGCC إلى ACG.

إن الفيرويد CLVd - N يظهر تماثل جزئى مع كثير من الفيرويدات تتبع بشكل أساسى إلى مجموعة PSTVd. إن نطاق الطرف اليسارى من CLVd - N يكون متماثل مع تلك الموجود فى الطرف اليسارى لكل من PSTVd وCSVd و CEVd و TASVd و ASSVd. أما نطاق الجانب الأيمن للفيرويد CLVd - N يتماثل مع فيرويد TPMVd و TASVd و PSTVd. إن الأربعة عشر نيوكليتيدة من CLVd - N الممتدة فى الخيط العلوى فى نطاق P متماثلة ١٠٠ ٪ مع المناطق الخاصة بها من فيرويد TPMVd، بينما ١٢ نيوكليتيدة (قطعة من الخيط السفلى) من النطاق P تكون متوافقة توافقاً نموذجياً مع المناطق المشابهة لها فى كل من PSTVd، TPMVd و TASVd. إن كلا الجزأين العلوى والسفلى من المنطقة

المركزيــة المحفوظة فى CLVd - N هــى نفسهــا مع الأجـزاء المتوافقــة مع فيرويد HSVd.

إن الدرجة العالية من تماثل التتابع بين الفيرويدات المختلفة قد عزيت إلى خلق فيرويدات مركبة عن طريق إعادة الاتحاد. وعلى أية حال فإن وجود تتابعات متطابقة فى نطاقات خاصة (C ،P والنطاقين الطرفيين) من CLVd - N وفيرويدات أخرى عديدة نشأت من أصول عديدة غير متعلقة مع النبات العائل الطبيعى، هذا يؤدى إلى القول بأن فيرويدات حديثة نشأت من أجداد مشتركة ثم تعرضت إلى تأثيرات أدت لحدوث تطورات متقاربة.

الفصل السادس

فيرويدات تحت مجموعة B_2 و B_3

أولاً : فيرويدات تحت مجموعة B_2

١ ـ فيرويدات التفاح

Apple Viroids

مقدمة :

يهاجم التفاح من قبل فيرويدين هامين هما ١ ـ فيرويد ندب الجلد فى التفاح Apple Scar Skin Viroid ويكتب باختصار ASSVd ٢ ـ فيرويد تنقط التفاح Dapple Apple Viroidويكتب DAVd .

إن فيرويد ندب الجلد فى التفاح ASSVd هو العامل المسبب لمرض ندب الجلد فى التفاح وهو عبارة عن جزئ RNA دائرى مفرد الخيط معدى يتكون من سلسلة طولها ٣٣٠ نيوكليتيدة. أما الفيرويدات الأخرى القريبة له وذات حجم مشابه لحجمه وتهاجم أشجار التفاحيات فهى فيرويد تنقط التفاح DAVd وفيرويد الجلد الصدأ فى الكمثرى Pear Rusty Skin Viroid (PRSVd). إن هذه الفيرويدات الثلاثة ASSVd ، DAVd و PRSVd هامة إقتصادياً على التفاح والكمثرى فى الصين واليابان، ولكن عائلها الطبيعى محدود فى التفاحيات. بذلت

محاولات لنقل هذه الفيرويدات إلى العوائل العشبية إلا أنها لم تنجح. طرق التشخيص الحالية لهذه الفيرويدات تتضمن: -

١ - الأعراض التى تظهر على الثمرة.

٢ - تحليل الحمض النووى المعزول بواسطة طريقة RGE.

٣ - تهجين الجزئ بمنقب ASSVd cRNA معلم بالفسفور المشع.

تحتاج هذه الفيرويدات إلى وقت طويل لتصل إلى مستويات يمكن اكتشافها بها فى عوائلها المصابة عن طريق الأعراض. إن هذا التأخير فى إظهار الأعراض الذى يحتاج تقريباً ١ - ٣ سنوات بعد الحقن لكى يمكن إظهار أعراض ASSVd و DAVd فى بادرات التفاح المحقونة، وتحتاج من ٥ - ٦ سنوات حتى تظهر الأعراض فى الثمار. زيادة على ذلك فإن هذه الفيرويدات التى تصيب ثمار التفاحيات توجد بكميات قليلة جداً تكاد تكون آثار فقط فى الأشجار المصابة ويختلف تركيزها بشكل كبير حسب إختلاف الأنسجة، هذا الاختلاف يتراوح أحياناً ما بين ١٠ - ١٠٠ ضعف.

إن سرعة تكبير (فى المعمل) أجزاء من تتابعات جينوم DNA أو نسخ، هى الآن ممكنة مع تخصص عال جداً ودقة باستعمال Taq I DNA Ploymerase فى تفاعل سلسلة البولى ميريز PCR. إن هذه الطريقة قد تبين بأنها ذات قيمة فى تحسين التشخيص فى كل من أمراض الإنسان الوراثية مثل مرض أنيما الخلايا المنجلية وفيرس نقص المناعة فى الإنسان وغيرها.

أ - مرض ندب الجلد فى التفاح

Apple Scar Skin Disease

يتسبب هذا المرض عن فيرويد ندب الجلد فى التفاح Apple Scar (ASSVd) Skin Viroid ويعتبر هذا المرض شديد الخطورة على التفاح **Malus domestica**،

ويتميز بظهور لون منقط وتشقق وتشوه فى الثمرة. الأعراض النموذجية تكون على شكل ندب موزعة على جلد الثمرة، إذا كانت هذه الندب كثيرة وشديدة هذا يؤدى حدوث تشقق فى جلد الثمرة، إذا كثرت الشقوق وزاد عمقها تسبب تشوه الثمرة. يبدو أن المرض نادر الحدوث فى الولايات المتحدة الأمريكية ولكنه واسع الإنتشار ومن الأمراض الخطيرة جداً والمهلكة للتفاح فى اليابان والصين. ظهر المرض فى ميسورى سنة ١٩٥٦ . الأعراض تظهر فقط على الثمار وبالتالى فإن الأشجار المتكاثرة عن مصدر شجرى مصاب يمكن أن يمضى على إصابتها عدة سنوات قبل أن تلاحظ أعراض المرض. وبالتالى فإنه من المهم أن تكون مصادر التكاثر خالية من المسبب المرضى ASSVd . ولسوء الحظ فإن الإختبارات البيولوجية لهذا الفيرويد تتطلب إظهار الأعراض فى الحقل وهذا يحتاج عدة سنوات ليكتمل، إلا أن الإختبارات الحديثة المتطورة باستعمال منقبات حمض نووى، يمكن فيها أن يكتمل الإختبار خلال بضعة أيام. هناك عدة أسباب تجعل استعمال الكواشف البيولوجية السريعة للفيرويد ASSVd مفيدة وهذه الأسباب هى :ـ

١ ـ إن أماكن الإختبارات فى كثير من أقطار العالم لا تكون مجهزة بأدوات استعمال منقبات حمض نووى.

٢ ـ إن فهرسة كواشف خشبية لا تزال مطلوبة للكشف عن كثير من الفيروسات الأخرى والعوامل المسببة المرضية الأخرى فى التفاح، وإن توفر الكاشف الخشبى السريع للفيرويد ASSVd يمكن أن يكون مفيد وملائم.

٣ ـ إن مثل هذه الكواشف يمكن أن تزودنا بتأكيدات حيوية للإختبارات المعملية.

إن الأشجار المصابة بالفيرويد ASSVd من التفاح المزروع Red Delicious والنوع Stark's Earliest و Sugar Crab تعتبر كاشف لهذا الفيرويد وتظهر عليها الأعراض على شكل تدلى الأواق إلى أسفل عندما تنمو فى الصوبا الزجاجية.

الأعراض على الثمار:

إن الثمار المتكونة على الأشجار المحقونة بالفيرويد ASSVd يتكشف عليها تشقق يبدأ بالقرب من الكأس بعد حوالى شهرين من تلقيح الأزهار (شكل ٧١). لم يلاحظ أية أعراض على الثمار من الأشجار المحقونة بالفيرس (لاستبعاد الفيرس كمسبب مرضى) ولا على الأشجار المستعملة كنترول وخالية من الفيرويد. كثير من الأشجار التى طعمت بالبرعم والتى من المفروض أنها تحمل بدايات زهرة لم تعط أزهار نتيجة الإصابة بالفيرويد وبالتالى فإن ٧٪ فقط من الأشجار التى طعمت بالبرعم ومحقونة بالفيرويد أنتجت ثمار وجميع هذه الأشجار ظهر عليها أعراض المرض.

الأعراض على المجموع الخضرى:

الإصابة الطبيعية التى تظهر فى الحقل لا تكون إلا على الثمار، أما فى التجارب التى تجرى على النباتات الكاشفة فيمكن أن يظهر عليها أعراض على المجموع الخضرى وهى بهذه الحالة تساعد كثير جداً فى الاختبارات الحيوية، وعدم الإنتظار لسن الإثمار.

أولى الأعراض ملاحظة فى الأشجار المحقونة بالفيرويد ASSVd هو تدلى الورقة وهذا يظهر واضحاً فى أشجار الكواشف التى ذكرناها سابقاً وهى Stark's Earliest وSugar Crab، بعد ستة إلى ثمانية أسابيع من الحقن. الأوراق الكاملة تتجعد وتلتف لأسفل مع إنحناء قمة الورقة جهة عنق الورقة وبالتالى تشكل نقطة قمة الورقة ونقطة القاعدة قطاع من شكل دائرة أو حرف C شكل ٧٢. يظهر التفاف فى الفروع الجانبية، مع إطالة مدة الحضانة يظهر مناطق ميتة متحللة على السطح السفلى للعرق الوسطى للورقة. يصعب تمييز الأعراض بين الثلاثة عزلات الخاصة بالفيرويد.

تأثير الحرارة والفترة الضوئية على حدوث وتكشف الأعراض:

إن درجات الحرارة المنخفضة وطول الفترة الضوئية تشجع حدوث وتكشف ظاهرة تدلى الأوراق وتزداد شدة المرض فى الأشجار المحقونة بالفيرويد ASSVd فى جميع أشجار Stark's Earliest ومعظم أشجار Sugar Crab. تظهر أعراض تدلي الورقة خلال ٥٨ يوم عندما تنمو الأشجار باستمرار تحت إضاءة وحرارة ١٨م (جدول ٤٩). أما عندما تنمو على ٢٨ْم تتضح الإصابة جيداً على الصنفStark's Earliest ولكن تظهر على أعداد قليلة من Sugar Crab حيث تعبر بالأعراض المنظورة. أيضاً فإن قليلاً من الأشجار المزروعة فقط تظهر تدلى الأوراق على هذه الحرارة وتحت ١٤ ساعة إضاءة.

لم يتكشف على أى من الأشجار المحقونة أعراض تدلى الأوراق عندما نمت على ٣٨ْم وتحت فترة قصيرة من ساعات الإضاءة، أو على ٤ ساعات إضاءة وأى درجة حرارة (جدول ٤٩). هذه الأعراض لم تظهر على أشجار الكنترول.

يظهر بقع شاحبة ويحدث تشوه من جانب واحد على أوراق الأشجار المحقونة بالفيرويد فى النوع Sugar Crab المستمر فى النمو على درجة ١٨ْم وفترة إضاءة ٤ ساعات يومياً، وعلى أية حال فإن نفس الأعراض تلاحظ عند إصابة الأشجار بالفيرس الكامن لهذا النوع من الأشجار.

تأثير الحرارة وفترة الإضاءة على معيارASSVd فى أشجار التفاح:

لقد حصل نتيجة إيجابية للتهجين بين منقب ASSVd cRNA ومستخلصات العرق الوسطى لعنق الورقة من أشجار تفاح نامية على ١٨ ساعة إضاءة ودرجة حرارة ٢٨ْم. إن تقدير المعيار النسبى للفيرويد مبنياً على كثافات إشارات التهجين فى المقارنة مع المعايير الداخلية المعروفة تؤدى إلى القول بأن طول النهار له تأثير قليل أو عدم تأثير على معيارASSVd.

يبدو أن معيار الفيرويد ينخفض على درجات الحرارة العالية. تلاحظ تفاعلات قوية فى إختبارات التهجين blot - hybridization فى جميع أجزاء الورقة على درجة ١٨ْم ولكن فقط فى الأوراق الوسطية والسفلى على درجة ٢٨ْم. لم يلاحظ أ

تفاعلات ظاهرة ولم يحصل عليها مع نسيج من أشجار نامية على ٣٨°م. جميع عزلات ASSVd تفاعلاتها متشابهة. لم يلاحظ تفاعلات إيجابية من مستخلصات من عنق الورقة المصابة بالفيرس الكامن أو أشجار الكنترول غير المحقونة.

تأثير نوع النسيج على معيار الفيرويد ASSVd:

عينات الفيرويد المحضرة من العرق الوسطى فى الأوراق وقواعد الأوراق يبدو أنها تشخيصياً أكثر دقة فى إختبارات Dot - blot hybridization من التحضيرات المأخوذة من نصل الورقة وذلك لأنها تنتج تفاعلات أشد قوة. إن المستخلصات من أعناق الأوراق المصابة بالفيرويد والتى قد حدث لها تجفيف هوائى على درجة حرارة الغرفة العادية تتفاعل تقريباً بنفس القوة فى إختبار Dot - blot مع منقب ASSVd cRNA كما فى مستخلصات من أعناق أوراق مقطوفة حديثاً.

جدول ٤٩ : تدلى الورقة كتعبير للأعراض المرضية على شجرة التفاح من Stark's Earliest وSugar Crab المحقونة بعزلة من فيرويد ASSVd المأخوذ من أشجار رد دلشص المصابة بمرض ندب الجلد وفيرويد تنقر التفاح وعزلة Heiya اليابانية ونامية على ظروف إضاءة وحرارة مختلفة.

طول اليوم بالساعة	درجة الحرارة (مئوية)	عدد الأشجار التى ظهر عليها أعراض تدلى الورقة / العدد الكلى للأشجار المحقونة					
		Stark's Earliest			Sugar Crab		
		تنقر التفاح	العزلة اليابانية Heiya	ندب الجلد	تنقر التفاح	العزلة اليابانية Heiya	ندب الجلد
٢٤	٣٨	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥
	٢٨	٥/٥	٥/٥	٥/٥	١/٥	١/٥	١/٥
	١٨	٥/٥	٥/٥	٥/٥	٥/٥	٤/٥	٥/٥
١٤	٣٨	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥
	٢٨	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥	١/٥	صفر/٥	صفر/٥
	١٨	صفر/٥	صفر/٥	٣/٥	٢/٥	٢/٥	صفر/٥
٤	٣٨	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥
	٢٨	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥
	١٨	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥	صفر/٥



شكل رقم ٧١ :

أعراض الإصابة بفيرويد ASSVd على ثمرة تفاح ذات عمر ثلاثة شهور.



شكل رقم ٧٢ :

أعراض تدلى الورقة على بادرات تفاح ذات عمر شهرين محقونة بفيرويد ندب جلد التفاح يلاحظ فى اليمين أعراض إنحناء الورقة فى قمة البادرة وأخذها شكل حرف C. البادرة فى اليسار سليمة.

يتبين لنا مما سبق أن فيرويدات ثمار التفاح يمكن أن تكتشف بسهولة فى أقل من شهرين وذلك عن طريق حقنها فى أشجار خشبية كاشفة تحت ظروف نمو متحكم بها، بالمقارنة باحتياجها إلى ٢ ـ ٣ سنوات إذا بقيت تحت ظروف الحقل العادية. هذه الطريقة يمكن أن تستعمل فى إعطاء شهادة بأن النباتات الخشبية يمكن أن تستعمل كواشف لاكتشاف الفيروسات أيضاً. هذه النتائج يمكن أن تؤكد بواسطة إختبارات cRNA hybridization لنسيج عنق الورقة، وعلى العكس من ذلك فإن هذه الاختبارات للكشف السريع يمكن أن تزود التأكيدات البيولوجية للمرض، حيث يستعمل تكنيك اكتشاف الحمض النووى بالتهجين فى المعمل.

لقد تم الحصول على الأعراض المرضية بسهولة خلال شهرين فى نسيج الثمار والمجموع الخضرى، وعلى أية حال فإن فائدة إختبار الثمرة قد توقف وذلك نظراً لانخفاض النسبة بين البراعم الزهرية والبراعم الخضرية المتكونة فى الأشجار المحقونة بالفيرويد من الصنف Stark's Earliest وكذلك بواسطة التكنيك غير الملائم للتمييز بين البراعم الزهرية والبراعم الخضرية (فى الفصول الساكنة) الأكثر شيوعاً.

مع أن الكواشف للفيرويد ASSVd المذكورة سابقاً لها وظيفة فى الحصول السريع على معلومات تشخيصة فإن طريقة Dot - blot hybridization تتطلب وقت أقل وتسمح بالكشف عن الفيرويد وتتابعاته الخاصة فى مستخلص الأنسجة والذى من الصعب توقعه بالنسبة للكواشف فى الأشجار الخشبية مثل الثمرة والبذرة والمجموع الخضرى.

إن الأعراض المنظورة وتفاعلات التهجين لمستخلصات عنق الورقة من الأشجار المختبرة، تدل على أن معيار الفيرويد ASSVd يتناقص بارتفاع درجة الحرارة خاصة بالقرب من قمة الشجرة. هذه الملاحظة تؤدى إلى القول بأن الأشجار الخالية من الفيرويد يمكن الحصول عليها من أشجار مصابة تحت درجات الحرارة العالية وباستعمال طريقة تكاثر القمة (كما فى فيرويد اكسوكوتز الحمضيات). مع أن

الفيرويدات تميل لأن تكون متحملة كثيراً للحرارة، إلا أن هذا الفيرويد ASSVd وفيرويد اكسوكورتز الحمضيات يمكن استبعادهما من النباتات بإطالة مدة تعرضهما للحرارة ٣٨°م ثم بعد ذلك تؤخذ قمم الفروع ويجرى لها إكثار للحصول على نباتات خالية من الفيرويد. إن فيرويد ASSVd يتجمع أكثر ما يمكن على درجة حرارة ١٨°م.

لقد ثبت بأن فيرويد ASSVd يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيدة وليس له علاقة بأى من الفيرويدات الأخرى.

ب ـ مرض تنقر التفاح

Dapple Apple Disease

إن مرض تنقر التفاح هو مرض مشوه للثمرة كان أول وصف له سنة ١٩٥٦ فى مزارع التفاح فى مقاطعة نيوهام بشير New Hampshire ووصف فى كولمبيا سنة ١٩٦١. يظهر المرض على شكل نقر مختلفة المساحة على الثمرة وقد تأخذ شكل بقع كبيرة وتتشوه الثمرة إذا كان الفيرويـد المسبب مقترناً مع فيرويد ASSVd. أعراض المرض واضحة لا لبس فيها إذ تكون التنقرات ذات لون مختلف قليلاً عن لون جلد الثمرة وتكون النقر متوزعة على سطح الثمرة، قد يحدث التباس مع مرض النقرة المرة فى التفاح المتسبب عن حالة فسيولوجية مثل نقص الكالسيوم والاضطرابات المائية فى التربة، إلا أن مرض النقرة المرة يجعل جلد الثمرة مثل جلد وجه الإنسان الذى اصابه جدرى وشفى منه (فى المراحل الأخيرة من إصابة ثمار التفاح).

تبين أن مسبب المرض ينتقل بالتطعيم وذلك منذ سنة ١٩٥٨. المرض ينتشر فى كندا، اليابان، بريطانيا، وايطاليا. ولقد ذكر أنه قريب الشبه مع مرض ندب الجلد فى التفاح. ولقد ذكر وصف لهذا المرض فى كل من الولايات المتحدة والصين

واليابان. إن المدى العائلى لهذا المرض محدود فى أشجار التفاحيات. متوسط الوقت الذى يلزم للتعريف السليم لهذا المرض بواسطة الأعراض على الثمار عند تطعيم الأشجار الخشبية التى تستعمل كاشف للمرض هو ثلاثة سنوات.

مسبب المرض:

يتسبب هذا المرض عن فيرويد تنقر التفاح Dapple Apple Viroid (DAVd) وهو يتكون من حوالى ٣٣٨ نيوكليتيدة (لم يتأكد الرقم بعد). لقد تبين وجود نوعين من RNA لهما وزن جزيئى منخفض مترافق مع الأحماض النووية المستخلصة من الثمرة المصابة بمرض ندب الجلد أو من نسيج القلف ولكن ليس من الأنسجة السليمة وإن RNA الأصغر دائرى. إن حقن بادرات التفاح بالحمض النووى الكلى غير المجزأ المأخوذ من نسيج مريض تبين أنه يحتوى RNA ذو حركة فى الهجرة الكهربائية تشبه الحمضين المرافقين للمرض من RNAs.

ولقد تبين أن الأحماض النووية المعزولة من أنسجة التفاح المريضة بمرض تنقر التفاح فى شمال أمريكا أعطت نتائج إيجابية مع منقب ASSVd cRNA وأن فيرويد تنقر التفاح (DAVd) ينتشر جهازياً فى بذور التفاح وفى الثمرة والقلف والورقة وفى أنسجة الجذر. إن أفضل طريقة سريعة لاكتشاف الفيرويد هى منقب SP6 generated ASSVd cRNA وهذه الطريقة تكشف أيضاً عن فيرويد ASSVd فى الأحماض النووية المستخلصة من النسيج المصاب.

من الدراسات الحديثة التى أجريت على فيرويد تنقر التفاح فى كل من أمريكا وكندا، تبين أنه فيرويد له تماثل تام وشديد التشابه مع فيرويد ندب الجلد فى التفاح المنتشر فى اليابان وهناك عدة إثباتات تدل على التطابق التام بين فيرويد DAVd وفيرويد ASSVd وهذه الاثباتات هى:

١ ـ إن ASSVd cRNA المعلم بالفسفور المشع يتهجن مع RNA من نسيج مصاب بالفيرويد DAVd وليس مع RNA من نسيج غير مصاب.

٢ ـ يحصل على إشارات قوية من التهجين مع RNA من الأنسجة المصابة فى أمريكا وكندا لمرض تنقر التفاح.

٣ ـ استعمال RNase بطريقة معينة يزيل الهجن التى حصل لها تزاوج غير ملائم.

٤ ـ RNA المهجن يكون بشكل أساسى موزع فى جزيئات محلول كلوريد الليثيوم والذى يميز الفيرويدات.

٥ ـ إن مقارنة الحركة فى الهجرة الكهربائية للفيرويد DAVd مع فيرويد PSTVd يؤدى إلى القول بأن الفيرويد DAVd يتكون من نيوكليتيدات أقل بكمية بسيطة عن ٣٥٩ نيوكليتيدة، هذا الحجم يكون متكامل مع حجم فيرويد ASSVd الذى يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيدة.

٦ ـ إن كل من ASSVd و DAVd ينتشر جهازياً فى أشجار التفاح المصابة جدول ٥٠.

إن تحليل فيرويد DAVd بطريقة Return gel electrophoresis يمكن أن تستعمل لكل من DAVd أو ASSVd من حيث التنقية والكشف والدراسات الأخرى. ويبدو من المعقول أن هناك سلالة من ASSVd تكون مرافقة لمرض تنقر التفاح فى شمال أمريكا.

الطريقة المفضلة لاكتشاف DAVd هى طريقة الكشف بالتهجين الجزيئى والتى تسمى Molecular hybridization detcion method بالإضافة إلى الطرق البيولوجية، ولهذه الطريقة فوائد منها:ـ

١ ـ يتطلب التعريف الموجب للمرض بضعة أيام للعمل على النسيج المصاب، بالمقارنة نحتاج إلى أكثر من ثلاثة سنوات لاكتشاف الفيرويد بالطريقة البيولوجية.

٢ ـ يمكن استعمال أنسجة مأخوذة من الورقة، القلف، الجذر، البذرة و / أو نسيج الثمرة فى هذه الطريقة أما فى طرق الكشف الحيوية فإن ثمار التفاح فقط هى التى تستعمل فى التشخيص.

٣ ـ إختبار cRNA دقيق ومتخصص وحساس جداً، وبالمقابل فإن أعراض الفيرويد ASSVd أو DAVd على ثمار التفاح تختلف بشكل كبير بين الأصناف المزروعة والمستعملة للكشف وتعتمد على ميتابولزم مركبات المواد الفينولية فى الثمرة. بالإضافة إلى هذه الصعوبات فى الإختبارت الحيوية فإن وجود بعض فيروسات التفاح والعوامل المسببة تشوه الثمرة يمكن أن تجعل تشخيص هذا المرض المبنى على أعراض الثمرة فقط، غير دقيق.

٤ ـ إن إختبار cRNA يكون غير مكلف نسبياً ولا يحتاج إلى مساحات كبيرة، بينما الإختبارات البيولوجية مكلفة وتحتاج معامل ومساحات أكبر.

إن اكتشاف الفيرويد ASSVd أو DAVd فى بذرة التفاح والأنسجة الخضرية يؤدى إلى القول بأن الفيرويد يمكن أن ينتقل خلال هذه الأنسجة. إن النقل بالأجزاء الخضرية وبالبذور يمكن أن يكون مخاطرة صعبة بسبب أن الفيرويد يمكن أن ينتقل من الأصل الجذرى للتفاح النامى من بذرة مصابة أو أنسجة خضرية إلى أنواع القلم المستعملة بالتطعيم. وبسبب أن DAVd أو ASSVd ينتشر جهازياً فى أشجار التفاح المصابة، فمن المحتمل أن ينتقل إلى المزارع عن طريق أدوات التقليم والتطعيم الطبيعى للجذر.

ولقد وجد فى بعض التجارب أن مستخلصات الحمض النووى من نوع تفاح آسيوى أعطت إختبار موجب مع منقب ASSVd cRNA المعلم بالفسفور المشع. إن الفيرويد ASSVd والفيرويد DAVd تستطيع أن تهاجم هذا النوع من التفاح الآسيوى بالإضافة إلى كثير من الأنواع الآسيوية الأخرى بدون أن تسبب أعراض

مرئية فى ثمارها. هذه الفيرويدات مجتمعة تستطيع أن تسبب ندب الجلد وتنقر وتشقق الثمار عندما تصيب مجموعة أصناف التفاح الأمريكية مثل رد دلشص وماكنتوش. وبالتالى عن طريق استعمال هذا الاختبار فإن أصناف التفاح الغربية يمكن أن تنقى بسرعة أكثر عند دخولها إلى أمريكا.

إن توفر منقبات عالية التخصص من ASSVd cRNA مع إجراءات استخلاص الحمض النووى وإختبارات التهجين تجعل هناك مراقبة على الإنتشار العالمى للمرضين المتسببين عن الفيرويدين ASSVd وDAVd.

اكتشاف الفيرويد ASSVd وDAVd فى مكونات البذرة والبراعم:

نتيجة التحليل للأحماض النووية بواسطة Northern blot hybridization للمستخلصات من أنسجة الثمار والبذور من أشجار التفاح المصابة طبيعياً وغير المصابة، كان هناك نتائج إيجابية لإشارات التهجين حصل عليها من جلد الثمرة ولحمها بالإضافة إلى البذور فى الثمار المصابة بفيرويد ندب الجلد. النتيجة الإيجابية لإشارات التهجين حصل عليها دائماً من الأحماض النووية من البذور فى جميع أصناف التفاح المزروعة والمصابة بالفيرودين ASSVd ، DAVd والمظهرة أعراض، بالإضافة إلى البذور المأخوذة من أصناف الكمثرى المصابة بفيرويد ASSVd .

جدول ٥٠: اكتشاف فيرويد DAVd أو ASSVd من أنواع التفاح الآسيوى ومن أنواع تفاح محلية فى أمريكا عن طريق التهجين الجزيئى مع SP6 مولد منقب ASSVd cRNA معلم بالفسفور المشع.

مصدر الأحماض النووية	نوع آسيوى ١	نوع آسيوى ٢٠٠٢٤	أشجار مصابة بفيرويد تنقر التفاح نوع واحد	أشجار مصابة بفيرويد تنقر التفاح نوع ٢	أشجار مصابة بالفيرويد ASSVd	أشجار كنترول
الأوراق	+	–	+	+	+	–
أوراق قديمة	+	+	+	+	+	–
قلف	+	+	+	+	+	–
أوراق حديثة جداً	+	+	+	+	+	–
جذور	+	+	+	+	+	–

الحمض النووى الكلى ٧٥ ـ ١٠٠ ميكوغرام / عينة، حللت بطريقة Dot blot hybridization وطريقة Northern blot hybridization. (+) تفاعل تهجين موجب، (–) تعنى تفاعل تهجين سالب.

ولقد ثبت أن الفيرويدين موجودان فى أغلفة البذرة وتحت الغلاف البذرى والفلقات والأجنة وكذلك فى جميع مكونات البذرة. إن نسبة الفيرويدات فى غلاف البذرة وتحت الغلاف أكثر منه فى الفلقات والأجنة، وباستثناء حبوب اللقاح فإن جمع أجزاء الزهرة تحتوى فيرويد.

لاكتشاف الفيرويد فى البرعم الخشبى، يؤخذ القلم (الطعم) المصاب بالفيرويد DAVd ويطعم على أصل تفاح ذو عمر سنة فى بداية الخريف (أول سبتمبر) أو فى أوائل الربيع من السنة القادمة، إما أن تزال قمم الأصل المطعم من فوق منطقة التحام الأصل بالطعم وذلك لإعطاء قوة للطعم لينمو إلى فروع جانبية محتوية DAVd المتناسخ أو أن تترك بدون إزالة وبالتالى فإن الفيرويد DAVd سوف يصيب الأصل النامى. تفحص نموات الطعم ونموات الأصل على فترات لاكتشاف DAVd بواسطة طريقة Northern blot hybridization. بعد شهرين يؤخذ عينة من قلف ونسيج ورقة من جميع الفروع النامية من القلم المطعوم وتختبر. وجد أن جميع النموات الناتجة من القلم المطعوم فيها فيرويد DAVd، ولكن الفروع النامية من الأصل لا يوجد فيها فيرويد أما عند إجراء الاختبار بعد أربعة شهور أخرى وجد ٢٥٪ إصابة فى هذه الأجزاء وتزداد هذه النسبة كلما تقدم الزمن وبعد سنتين بالتمام وجد الفيرويد فى جميع أجزاء الأصل، أى أن الأصل وجميع فروع الطعم أصبحت محتوية فيرويد DAVd.

بناءً على ما تقدم نستطيع أن نقول إن فيرويد ASSVd وفيرويد DAVd هى فيرويدات كامنة فى البذور وبالتالى فهى أكثر ميلاً لأن تنتقل بالبذور (إلا أن هذا لم يثبت بعد بالتجربة). مع أن ثمار أشجار التفاحيات تصاب بكثير من الفيروسات وعوامل شبيهة بالفيرس، إلا أنه لم يثبت لأى من هذه الممرضات بأنه كامن فى بذور التفاح والكمثرى باستثناء العامل المسبب مرض اصفرار العروق فى الكمثرى. وبالتالى يمكن القول بأن كل من ASSVd و DAVd هما أول العوامل الممرضة الفيرويدية قد عرفا بأنهما يتواجدان فى بذور ثمار التفاح.

إن اكتشاف هذين الفيرويدين فى بذور العائل يشبه اكتشاف فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd فى بذور البطاطس الحقيقية، إلا أن إنتشار فيرويد PSTVd فى مكونات البذور المصابة لم يحدد تماماً. إن ارتفاع نسبة وجود كل من ASSVd و DAVd فى أغلفة البذور وتحت الغلاف يؤدى إلى القول بأن معظم جزيئات الفيرويد فى البذور المصابة يبدأ من تناسخ الفيرويد فى بويضات الزهرة. كذلك فإن اكتشاف كميات قليلة جداً من الفيرويد فى أجنة البذور المصابة يؤدى إلى القول بأن الفيرويدات الموجودة فى الجنين يمكن أن تكون قد نشأت من المبايض ولو من ناحية نظرية لغاية الآن.

كذلك فإن عدم وجود الفيرويد فى حبة اللقاح، هذا يعنى أن الفيرويد لا ينتقل عن طريق حبوب اللقاح كما أنه لا يتمركز فى حبوب اللقاح. وإن وجود الفيرويد ASSVd أو DAVd فى الأشجار المنتجة ثمار من التفاحيات على الأقل لمدة سنتين متتابعتين بالإضافة لاكتشاف الفيرويد DAVd فى البادرات المصابة باستمرار لعدة سنوات من بعد اكتشافه الأولى، يؤدى إلى القول بأن هذه الفيرويدات دائمة فى الأنسجة المصابة ونظراً لأن الفيرويدين كامنين فى البذور وبالإضافة إلى احتمالية إنتقالهما بالبذور بالإضافة إلى استمراريتهما فى النسيج المصاب، كل ذلك يجعل فهرسة ثمار التفاحيات ضرورية لمعرفة إصابتها بالفيرودين، مع أنه فى السابق كان ينظر إلى ثمار التفاح بأنها خالية من الفيرس والفيرويد.

لفهرسة البرعم الخشبى budwood للفيرويدين ASSVd أو DAVd يمكن أن يتم ذلك عن طريق إتحاد الطرق البيولوجية والجزيئية. يجب أن يجرى الحقن بالبرعم أو التطعيم بالقلم فى الخريف أو الربيع ويسمح له بالنمو وذلك لزيادة معيار الفيرويد فى النسيج المصاب ثم بعد ذلك تفحص أنسجة القلف أو ورقة من البرعم النامى لاكتشاف الفيرويد بطريقة التهجين الجزيئى لمستخلص الحمض النووى بـ ASSVd cRNA المعلم بالفسفور المشع. وبسبب أن ASSVd و DAVd دائمة

الوجود فى الأجزاء النباتية المصابة ولأنها منتشرة جهازياً فى النسيج المصاب فإن الإختبارات السابقة الذكر يمكن أن تجرى على نسيج مجموع من نموات فصل النمو الأول ثم على ما بعد ذلك من نموات.

جـ ـ مرض تغضن ثمرة التفاح

Apple Fruit Crinkle Disease

يتسبب هذا المرض عن فيرويد يسمى فيرويد تغضن ثمرة التفاح Apple Fruit Crinkle Viroid ويكتب (AFCVd). لغاية سنة ١٩٩٤ لم يذكر أن المرض ينتشر خارج اليابان. تظهر أعراض المرض على شكل تغضن فى جلد الثمرة وتبدو وكأنها تميل إلى شئ من التكرمش إذا كانت الإصابة شديدة. ينتقل هذا المرض بالتطعيم. للفيرويد حجم جزيئى أكبر من حجم فيرويد ندب الجلد فى التفاح ويقارب من حجم فيرويد تنقر ثمار التفاح. الأبحاث الأولية أعطت لهذا الفيرويد رقم ٣٤٠ نيوكليتيدة إلا أن هذا الرقم تقريبى ولم يتأكد بعد. إن فيرويد AFCVd لا يتهجن معASSVd cDNA. يمكن نقل الفيرويد إلى بادرات التفاح بواسطة Electro Phoretically Purified Preparations بواسطة طريقة Razer - Slash. إن هذا الفيرويد يتميز فى جميع صفاته عن فيرويدى التفاح ASSVd وDAVd.

٢ ـ فيرويدات الكمثرى

Pear Viroids

تصاب أشجار الكمثرى **Pyrus communis** بثلاثة فيرويدات مختلفة وهى: ـ

1 - Pear Blister Canker Viroid = (PBCVd)

2 - Pear Rusty Skin Viroid = (PRSVd)

3 - Apple Scar Skin latent Viroid = (ASSLVd)

الفيرويد الذى استطعنا أن نتحصل على معلومات عنه هو الفيرويد الأول، أما الفيرويد الثانى والثالث فلم أستطع الحصول على ما يكفى من معلومات لتوضع فى هذا الكتاب إما لقلة الأبحاث وإماالقصور منى وإما لكليهما معاً.

مرض البثرة المتقرحة فى الكمثرى

Pear Blister Canker Disease

مقدمة :

هناك أمراض كثيرة تسبب تشوهات واضطرابات فى قلف أشجار الكمثرى وصفت فى أوروبا وأمريكا، ومن ضمن هذه الأمراض، مرض البثرة المتقرحة فى الكمثرى الذى وصف سنة ١٩٦٠، ومرض القلف الخشن فى الكمثرى الذى وصف سنة ١٩٥٧، مرض تشقق ونكروزز اللحاء فى الكمثرى الذى وصف سنة ١٩٦٥ و ١٩٦٧ ومرض جدرى القلف measles الذى وصف سنة ١٩٦١. ولقد ذكر أن حوالى ٥٪ من الكمثرى المزروعة فى أوربا تحمل أى من هذه الأمراض، وكثير من الأصناف تكون حاملة للمرض بدون إظهار أعراض إما أن تكون Carrier أو Tolerant.

من المفترض أن جميع هذه الأمراض تتسبب عن فيروسات ولكن نتيجة الأبحاث تبين أن بعض هذه العوامل المسببة متحملة للحرارة يعنى لا يمكن استبعاد المسبب بالحرارة، ونظراً لأن الفيروسات أقل تحملاً للحرارة من الفيرويدات وبالتالى اعتبرت هذه الأمراض متسببة عن فيرويدات، هذا من ناحية منطقية فقط ولابد من إجراء طرق الكشف كلها بعد ذلك لإثبات ما يقال.

أعراض المرض:

يظهر المرض على شكل بثرات صغيرة على قلف الساق، تزداد فى العدد والحجم وتتكشف إلى تشققات فى بداية الربيع، تظهر الأعراض على بادرات الكمثرى ذات عمر سنتين، إذا كانت الإصابة شديدة يمكن أن تموت البادرات أو الأغصان أو كليهما معاً. الأشجار التى تبقى حية وعليها إصابة ينخفض إنتاجها من

الثمار عنه فى الحالة الطبيعية. إذا كانت الإصابة خفيفة تكون الأعراض قليلة أقل من أن تقشر القلف وتصلبه، وإذا كانت الإصابة شديدة تظهر الأعراض على شكل تقشر القلف بشكل كبير وهذا العرض يحدث التباس مع أعراض الإصابة الفطرية.

تظهر الأعراض على الساق فقط أما الثمار والأوراق فلا يظهر عليها أية أعراض. تبدأ الأعراض فى الظهور فى السنة الثانية بتشققات خارجية على سطح القلف وفى الابيديرمز ثم بعد ذلك تتحول إلى تشققات كثيرة ومنتشرة على الساق شكل ٧٣. تتعمق التشققات حتى تكاد تتسبب فى سقوط مساحات من القلف وقد تسبب موت الشجرة أحياناً أو ينخفض نموها وتعيش لمدة قصيرة.

أهم الأنواع والتى هى حساسة وكاشفة لهذا المرض هى أشجار الكمثرى**Pyrus communis A. 20** حيث تظهر الأعراض النموذجية على هذا الصنف وتتميز بأن تكون على شكل قشور.



شكل رقم ٧٣ :

أعراض الإصابة بفيرويد PBCVd . البثرة المتقرحة فى قلف الكمثرى.

مسبب المرض:

يتسبب هذا المرض عن فيرويد ويسمى Pear Blister Canker Vir-(PBCVd) oid. شكل ٧٤ يبين التركيب الثانوى لهذا الفيرويد. إن فيرويد PBCVd هو RNA دائرى يتكون من ٣١٥ نيوكليتيدة. وتركيبه العام يتكون من ٩٩ قاعدة G (حوالى ٣١,٤ ٪) و٩٢ قاعدة C (٢٩,٢ ٪) و ٥٤ قاعدة A (١٧,١ ٪) و٧٠ قاعدة U (٢٢,٢)، وبالتالى فإن محتوياته من G + C حوالى ٦٠,٦ ٪ مشابهاً بذلك الفيرويدات الأخرى باستثناء فيرويد ضربة الشمس فى الافوكادو ASBVd. وكذلك فإن هذا الفيرويد مثل بقية الفيرويدات الأخرى لا يعمل تشفير لأى بروتينات.

إن التركيب الثانوى الأكثر ثباتاً لفيرويد PBCVd هو الشكل المتفرع مع طاقة حرة 365.7 KJ / md - إن الفحص للتركيبات البديلة ضمن ١٠ ٪ من قيمة أقل طاقة حرة أظهرت أنه لا يوجد للفيرويد شكل شبه عصوى.

فى التركيب الثانوى المفترض لهذا الفيرويد فإن ٦٧,٦ ٪ من نيوكليتيداته هى أزواج وأن نسبة GC ٦٤,٤ ٪ و AU ٢٢,٤ ٪ و GU ١٣,٢ ٪. كذلك فإن هذا الفيرويد يحتوى تتابع CCR والذى يميز أفراد تحت مجموعة B_2 والتى يطلق عليها اسم apscaviroids (تعنى مجموعة فيرويد ندب الجلد فى التفاح ASSVd) وهذا الاصطلاح وضعه Elena سنة ١٩٩١ ليجمع الفيرويدات التى تشابه فيرويد ندب الجلد فى التفاح فى معظم صفاتها فى مجموعة واحدة سماها apscaviroids وهذه المجموعة ذكرناها فى التصنيف فى الجزء الأول من الكتاب بأنها تحت مجموعة B_2. أما الفيرويدات التى تشابه فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس فسماها مجموعة Pospiviroids وذكرنا اسمها فى الجزء الأول من الكتاب تحت مجموعة B_1.

من التركيب السابق لفيرويد PBCVd يتبين عدم وجود U الموجودة على نهاية -3` من CCR فى الخيط السفلى من الخمسة فيرويدات الأخرى التى تمثل تحت مجموعة B_2 (apscaviroids) وهى :-

ASSVd = Apple Scar Skin Viroid

GYSVd = Grapevine Yellow Speckle Viroid

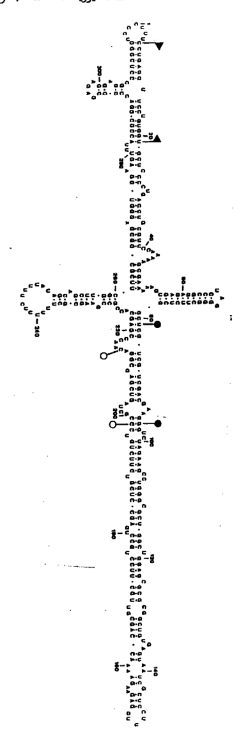
G1BVd = Grapevine 1B Viroid

AGVd = Australian Grapevine Viroid

CBLVd = Citrus Bent Leaf Viroid

إن تتابع الفيرويد PBCVd منطبق مع الخيط العلوى من حيث CCR وإن ١٢ مركز المحيطية الجانبية على أى جانب والذى يمثل مجموع ٤٠ نيوكليتيدة عندها المقدرة لتشكيل تركيب متعاكس Palindromic مع إما نفس التتابع من جزئ آخر من PBCVd أو من منطقة أخرى multimeric لجزئ الفيرويد، هذا التتابع لأربعين قاعدة يستطيع أن ينثنى ويشكل تركيب عروة. كلا الصفين من التركيب ذكرت لأفراد أخرى من apscaviroids، بالإضافة إلى تحت مجموعة الفيرويدات التى يمثلها PSTVd (Pospiviroids) مثل CCVd (Cocaviroid) و hop stunt viroid و Coleus blumei 1 (Cb1Vd)، ولقد إفترض على أنها تلعب دوراً فى تجهيز وسيطات الفيرويد Oligomeric بالإضافة إلى الخيط العلوى والسفلى فإن منطقة CCR فى الفيرويد PBCVd تستطيع بكفاءة أن تتخذ شكل صليبى كما فى بعض أفراد apscaviroids شكل ٧٤.

كذلك فإن الفيرويد PBCVd له منطقة حفـظ طرفـية-Terminal Con (TCR) served region تبـدأ مـن موقـع ٥ إلـى ٢١ وتتكـون من CCUGAGGUUCCUGUGGU وهذه المنطقة محفوظة فى جميع أفراد pospiviroids و apscaviroids فى مواقع مشابهة. كذلك فإن هذا الفيرويد كما فى بقية الفيرويدات النموذجية غنى بتتابع الأدنين Adenine فهو من هذه الناحية يتضمن ١٣ مركز من ضمنها ١٠ ادنين بين موقعى ٤٢ و ٤٥ وهو كذلك غنى فى تتابع اليوراسيل Uracil ففيه ١١ قاعدة يوراسيل فى موضعى ٢٣٧ و ٢٤٧.



شكل رقم ٧٤ :

التركيب الثانوى المتوقع لفيرويد PBCVd. منطقة TCR محددة بالإعلام ومنطقة CCR فى الخيط العلوى محددة بدوائر سوداء أما فى الخيط السفلى محددة بدوائر غير مطموسة.

مقارنة فيرويد PBCVd مع فيرويدات أخرى:

يتميز فيرويد PBCVd بأن فيه تماثل تتابع كلى عال متشابه مع فيرويد G1BVd و CBLVd. (٥٢,٤٪ للأول و ٥٠,٦٪ للثانى). إن التشابة بين هذا الفيرويد وبين الفيرويدات الأخرى يتضمن بالإضافة إلى أل ٣٣ موقع النموذجى من CCR العلوية والسفلية الموجودة فى جميع أفراد تحت مجموعة ASSVd و ١٢ موقع فى TCR فإن هناك تتابعات أخرى عديدة متوزعة بطريقة سمتية على نفس الخط فى هذه الفيرويدات. كذلك فإن فيرويد PBCVd يحوى أيضاً مناطق والتى هى ذات علاقة للتتابع الموجود فى الفيرويدات الأخرى. هذه العلاقة التتابعية تدل على أن فيرويد PBCVd له تركيب معين يتكون من تتابع فريد عن الفيرويدات التى تنتمى إلى تحت مجموعات الفيرويدات الأخرى. إن الجزء الأيسر من هذا الفيرويد يماثل فيرويدات تحت مجموعة فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس، بينما الجزء الأيمن يشمل منطقة CCR فيه مناطق تشابه تلك الموجودة فى فيرويدات تحت مجموعة B_2. هناك إمتدادات قصيرة من المراكز تقع بين مركز ١٦٦ و ٢٥٧ تظهر تماثل متطابق مع ASBVd وفيرويد CTiVd و PLMVd.

الصفات العامة للفيرويد:

إن تتابع النيوكليتيدات الكامل للفيرويد PBCVd يبين أنه جزئ دائرى يمتلك عناصر تركيبية مشتركة مع الفيرويدات النموذجية الأخرى، إنه يحوى CCR مشابهة لما هو فى مجموعة apscaviroids ولكن يفتقر إلى النهاية الطرفية -`3 التى فيها U فى الخيط السفلى والموجودة فى الأفراد الأخرى من تحت هذه المجموعة. وبالتالى فإن التتابع المحفوظ من ال CCR فى تحت مجموعة apscaviroids تنخفض إلى ٣٣ موقع من النيوكليتيدات، ١٦ منها متعلق بالخيط العلوى و ١٧ للخيط السفلى. كذلك فإن الفيرويد PBCVd يحتوى ال TCR الموجودة فى تحت مجموعة pospiviroids وتحت مجموعة apscaviroids ومنطقة غنية بالادنين فى الموقع العادى على الجانب الأيسر من الخيط العلوى. وعلى أية حال فإن هذه

المنطقة الأخيرة ليست أزواج قواعد مع التتابع الغنى باليوراسيل الموجود فى الخيط المقابل فى التركيب الثنائى للفيرويد PBCVd من موقع ٢٣٧ إلى ٢٤٧ بالمقارنة مع تلك الموجودة فى الفيرويدات النموذجية.

إن الصفة الغريبة لهذا الفيرويد هى عدم وجود تنوعات تتابع له. إن هذه الظاهرة تتكرر فى حالات معينة مع الفيرويدات التى تخضع لعمليات تصفية فى العائل، فى هذه الحالة يمكن أن تختفى ظاهرة تنوعات التتابع، أما هنا فلا يخضع الفيرويد لمثل هذه التصفية وبالتالى فإن هذه الصفة متأصلة فيه. إن تماثل التتابل الملاحظ فى PBCVd يمكن أن يكون دلالة على تركيب قوى أو / و وظيفة إجبارية. إن شرح التتابعات الإضافية الموجودة فى عزلات أخرى للفيرويد PBCVd والتى تحدث تفاعل مشابه فى شجرة الكمثرى الكاشفة A20 ستساعد فى توضيح هذا السؤال مستقبلاً إن شاء الله.

ونظراً لأن الأجزاء المختلفة من PBCVd أيضاً تظهر تماثل ملحوظ مع فيرويدات من تحت مجموعات أخرى يؤدى إلى القول بأن هذا الفيرويد قد نشأ عن طريق إعادة الاتحاد فى RNA، هذه الاحتمالية قد فرضت للفيرويدات الأخرى. فى غالبية الحالات فإن إعادة الاتحاد يبدو أنها تتدخل فى تغيير قطع بين الفيرويدات التى تتبع إما لنفس تحت المجموعة أو لأخرى قريبة العلاقة بها. وعلى أية حال فإن إعادة الاتحاد بين الفيرويدات من تحت المجموعات المختلفة ملاحظة بشكل خاص فى بعض أفراد apscaviords. إن العائل المتعاون فى دعم تناسخ الفيرويدات المختلفة يمكن أن يسمح فى تغيير RNA. وقد ذكر فى هذا المجال ما يحدث فى الكمثرى من عزلة فيروید HSVd - pear وفيرويدين آخرين مشابهين فى الحجم والتتابع لفيرويد ASSVd. وعلى أية حال فإن PBCVd يبدو أنه قد نشأ بواسطة إعادة الاتحادة بين هذه الفيرويدات، بالإضافة إلى عوائل مختلفة من الكمثرى تخدم كوسيط إحتياطى لفيرويدات مميزة وتسمح بحوادث إعادة الاتحاد بينها.

أخيراً فإن التركيب الثانوى المتفرع على أقل طاقة حرة متحصل عليها للفيرويد PBCVd تدل على أن هذا الفيرويد لا يتطابق مع التركيب شبه العصوى. إن هذا الوضع ليس فريداً للفيرويد PBCVd بل يمكن أن يحدث هذا الشئ لأفراد كثيرة من تحت مجموعة apscaviroids حيث أنها تحدث شكل متفرع باستثناء AGVd تحت ظروف معينة. إن تكوين الشكل المتفرع قد إفترض أيضاً لكثير من الفيرويدات من ضمنها ASBVd وفيرويد تقزم قمة الطماطم TASVd وفيرويد PLMVd وغيرها.

العوائل المشخصة:

إن طريقة PAGE وطريقة Northern blotting ذات فائدة كبيرة فى سرعة اكتشاف الفيرويد، بينما فى النباتات الكاشفة يحتاج الفيرويد إلى يومين حتى ينتقل من اللقاح إلى النبات. مع أن نبات الخيار يستطيع أن يبقى ويساند تكاثر الفيرويد PBCVd إلا أنه ليس عامل مشخص جيد لأنه لا يتفاعل ويعطى أعراض واضحة مع الفيرويد. إلا أن العائل المشخص هو ما ذكر فى أول هذا الموضوع وهو الكمثر A20 **Pyrus communis**. وجد أن الفيرويد لا يتكاثر فى **Gynura** ولا فى الطماطم ولا الأقحوان.

للفيرويد ثلاثة عزلات متماثلة هى P2098T ، P1914T و P49T.

٣ـ فيرويدات العنب

Grapevine Viroids

مقدمة:

هناك عدة فيرويدات وكائنات أخرى شبيهة بالفيرويدات ذكر بأنها تهاجم أصناف العنب والأصول النباتية التى يطعم عليها العنب. وإن عمليات الحصر التى تؤدى إلى تقدير إنتشار هذه المسببات المرضية خلال مدى واسع من المصادر المدروسة جيداً أظهر بأن الفيرويدات موجودة فى جميع النباتات المختبرة فى استراليا، فقط بعض البادرات تبين أنها خالية من الفيرويدات وهذا يرجع لعدم إنتشار الفيرويد خلال البذور.

إن هذا الإنتشار الواسع لجزيئات الفيرويد من المحتمل أن يكون نتيجة لعدة عوامل والتى تعرف بأنها مناسبة لانتقال الفيرويد والعوامل الممرضة الشبيهة بالفيرويد وهذه العوامل تشمل التكاثر الخضرى المستمر للعنب على زمن طويل وأجيال متتابعة، الاستعمال المستمر للأصول ذات الكفاءة العالية والتى هى مصابة بالفيرويد، استعمال المواد النباتية بطريقة غير صحية واحتمالية الانتقال الميكانيكى عن طريق الأدوات الزراعية خلال التقليم والجمع.

تتعرض شجيرات العنب **Vitis vinifera** للإصابة بالعديد من الأمراض تظهر هذه الأمراض على شكل التفاف الأوراق، تبرقش الأوراق، تفلن القلف وتنقر الخشب، النقط الصفراء. تنتشر هذه الأمراض فى معظم زراعات العنب فى العالم وتسبب خسائر إقتصادية هامة. كانت تعزى هذه الأمراض إلى مسببات فيروسية وذلك

بالاعتماد على طرق نقلها وبسبب الأعراض التى تحدثها وتشبه تلك المتسببة عن فيروسات. بعد الدراسات العديدة تبين أن مسببات هذه الأمراض هى فيرويدات.

إن أول التقارير التى كانت تشير إلى وجود الفيرويدات فى العنب كانت سنة ١٩٨٤، حيث ذكر العالم Sano et al فى اليابان أنه أمكن عزل فيرويدات من العنب. كذلك سنة ١٩٨٥ ذكر Flores et al فى أسبانيا أن كثير من نباتات العنب مصابة بالفيرويد وقد أمكنه عزل بعض الفيرويدات من العنب وفى سنة ١٩٨٦ ذكر فى كاليفورنيا ظهور أعراض مرضية بالفيرويد فى نباتات العنب. بعد ذلك إنتشرت الدراسات على فيرويدات العنب.

لقد أجريت دراسات عديدة على فيرويدات العنب واكتشفت فيرويدات عديدة فى مناطق جغرافية مختلفة وكان يعطى لهذه الفيرويدات أسماء مختلفة حتى أن الفيرويد الواحد فى منطقتين مختلفتين يعطى إسمين مختلفين. إن إنتشار الأبحاث وكثرة اكتشاف فيرويدات على العنب جعل من الصعوبة بمكان حصر هذه الفيرويدات مع كثرة هذه المسميات، مما حدى بالمؤتمر الدولى العاشر لدراسة الأمراض الفيروسية والأمراض الشبيهة بالفيرس على العنب المسمى International Council For The Study of Viruses And Virus - Like Diseases (ICVG) of The Grapevines المنعقد فى اليونان سنة ١٩٩١ وكذلك المؤتمر الدولى لدراسة الفيروسات (ICTV) International Committee On Taxonomy of Virses سنة ١٩٩٢ بتحديد أسماء الفيرويدات التى تصيب العنب فى خمسة أنواع، بغض النظر عن جميع الأسماء السابقة أو الأماكن الجغرافية التى اكتشفت فيها والأسماء هى:ـ

١ ـ مجموعة الفيرويدات التى هى عزلات من فيرويد اكسوكورتز الحمضيات ويرمز لها CEVd - g

٢ ـ مجموعة الفيرويدات التى هى عزلات من فيرويد تقزم حشيشة الدينار ويرمز لها HSVd - g

٣ ـ مجموعة الفيرويدات التى تصيب العنب الاسترالى وتكتب AGVd

٤ ـ مجمـوعـة الفيرويـدات التى تسـبب مـرض النقطـة الصفـراء فـى العنب Yellow Speckle وهى تسبب أمراض واضحة على العنب وتتكون من فيرودين: ـ

أ ـ فيرويد النقطة الصفراء فى العنب رقم ١ ويكتب باختصار GYSVd - 1

ب ـ فيرويد النقطة الصفراء فى العنب رقم ٢ ويكتب باختصار GYSVd - 2

المجموعة الأولى يمثلها فيرويد واحد هو فيرويد اكسوكورتز الحمضيات عزلة العنب CEVd - g وكذلك المجموعة الثانية يمثلها فيرويد تقزم حشيشة الدينار عزلة العنب HSVd - g . إن هذين الفيرودين لم يذكر أنهما يسببان أعراض واضحة على العنب ولكنها تعزل من العنب المصاب بالأمراض.

كذلك فإن المجموعة الثالثة لا تسبب أعراض واضحة على العنب وهى عبارة عن فيرويد منتشر فى استراليا بشكل كبير وهو يعزل من جميع نباتات العنب التى يظهر عليها أعراض مرضية. هناك محاولة من بعض العلماء بإضافة فيرويد آخر لهذه المجموعة يعزل من الخيار إلا أنه لغاية ١٩٩٤ لم يوافق على إضافة هذا الفيرويد. أما المجموعة الرابعة فهى تشمل الفيرويدات التى تسبب مرض النقطة الصفراء فى العنب وتكون أعراضها ظاهرة.

لقد أجمعت المؤتمرات الدولية أن فيرويدات العنب لا تتعدى هذه المجموعات بغض النظر عن التوزيع الجغرافى أو المسميات القديمة.

أما من حيث التصنيف فإن المجموعة الأولى والثانية، تتبع فيرويدات المجموعة B وتحت مجموعة B_1 الذى يمثلها فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd. أما فيرويدات المجموعة الثالثة والرابعة فهى تتبع فى التصنيف فيرويدات تحت

مجموعة B_2 الذى يمثلها فيرويد ندب الجلد فى التفاح والذى يكتب ASSVd. إن جدول ٥١ يبين هذه المجموعات وبعض صفاتها.

جدول ٥١: يبين مجموعات فيرويدات العنب وبعض صفاتها.

اسم الفيرويد الحالى	عدد النيوكليتيدات	مجموعة التصنيف	المرضية على العنب	عائلة العشبى	بعض الأسماء القديمة
CEVD - g	٣٧١	تحت مجموعة B_1	لم تذكر أعراض على العنب	الطماطم	GVs
HSVd - g	٢٩٧	تحت مجموعة B_1	لم تذكر أعراض على العنب	الخيار	GV3
AGVd	٣٦٩	تحت مجموعة B_2	بدون أعراض	الطماطم والخيار	—
GYSVd - 1	٣٦٧	تحت مجموعة B_2	نقطة صفراء	غير محدد	GVF, GV1
GYSVd - 2	٣٦٣	تحت مجموعة B_2	نقطة صفراء	غير محدد	GV2, GV1B

أ ـ فيرويد العنب عزلة فيرويد تقزم حشيشة الدينار

Hop Stunt Viroid - Grapevine HSVd - g

لقد أمكن عزل فيرويد من زراعات العنب فى اليابان وكان أصل هذه الزراعات مستورداً من أوروبا الغربية واستراليا وأمريكا بالإضافة إلى الزراعات الأصلية فى اليابان، ولقد وجد هذا الفيرويد فى ٢٨ نوع من العنب من بين ٣٢ نوع إختبرت أى بنسبة ٨٨٪. إن هذا الفيروبد عبارة عن عزلة من فيرويد تقزم حشيشة الدينار. إن هذه العزلة من الفيرويد لها مدى عائلى وتسبب أعراض فى نباتات الخيار مشابهة تماماً لتلك التى يسببها فيرويد تقزم حشيشة الدينار HSVd. إن تتابع النيوكليتيدات فى هذه العزلة سواء المأخوذة من فرنسا أو ألمانيا أو هنجاريا أو اليابان متشابهة تماماً وهى تشكل جزئ دائرى يتكون من ٢٩٧ نيوكليتيدة. إن هذا التتابع الموجود فى هذه العزلة يختلف عن ذاك التتابع الموجود فى الفيرويد الأصلى لتقزم حشيشة الدينار HSVd بنيوكليتيدة واحدة فقط، وتقل عن عزلة HSVd - c (عزلة الخيار) بستة نيوكليتيدات وفيها ١٥ نيوكليتيدة مختلفة. هذا الفيرويد هو HSVd - g فيه

٩٥٪ تماثل تتابع. إن هذا الفيرويد أطلق عليه فيرويد تقزم حشيشة الدينار عزلة العنب وذلك لأنه يعزل دائماً من العنب الذى تظهر عليه بعض الأعراض المرضية واعتماداً على ذلك فقد إقترح بأن العنب هو مصدر فيرويد تقزم حشيشة الدينار فى اليابان.

يؤثر هذا الفيرويد على أعناب الخمور فى جميع أنحاء العالم سواء كانت أصول أو مطعومة. إذا حقنت هذه العزلة فى نباتات الخيار فإنه يظهر على الخيار أعراض تقزم وشفافية عروق وتتجعد الأوراق، يحدث ذلك بعد ٣ ـ ٤ أسابيع من الحقن، أما عند حقن هذه العزلة فى حشيشة الدينار فإن ظهور الأعراض يتأخر أسبوع عن أعراض العزلة الأصلية من فيرويد تقزم حشيشة الدينار.

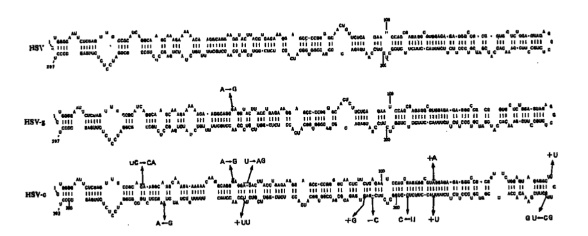
كما ذكرنا سابقاً فإ هذه العزلة مشابهة فى عدد النيوكليتيدات لفيرويد تقزم حشيشة الدينار فهى تتكون من ٢٩٧ نيوكليتيدة وتبلغ نسبة تماثل التتابع فيها ٩٩٪ بالنسبة للعزلة الأصلية HSVd، و ٩٥٪ بالنسبة لعزلة الخيار HSVd - c، إلا أن عزلة HSVd - g تقل بستة نيوكليتيدات عن عزلة الخيار (شكل ٧٥). تختلف عزلة العنب عن الفيرويد الأصلى HSVd فقط فى موقع الأدنين على مركز ٥٤ فى HSVd ويصبح جوانين فى عزلة العنب. كذلك فإن عزلة العنب تختلف عن عزلة الخيار فى ١٥ نيوكليتيدة، إلا أن موقع ٥٤ فى عزلة الخيار يشبه عزلة العنب فى كونه جوانين .Guanine. وبالتالى يمكن القول بأن التركيب الثانوى المقترح لعزلة العنب يشبه تماماً تركيب الفيرويد الأصلى HSVd.

من الصعوبة تمييز الأعراض على الخيار المتسببة عن العزلات الثلاثة (العنب ـ الخيار وحشيشة الدينار) إلا أن عزلة العنب أكثر قرباً وعلاقة مع الفيرويد الأصلى HSVd من عزلة الخيار.

هناك تفسيرات عديدة لوجود عزلة من الفيرويد HSVd تهاجم العنب، بعض هذه الاقتراحات تقول إن الأصل هو فيرويد يصيب العنب ومنه نشأت سلالة

تصيب حشيشة الدينار وذلك لأن العنب قد دخل اليابان قبل حشيشة الدينار وأن كلاهما يزرع فى مناطق متقاربة وبالتالى يمكن أن يكون الأصل هو فيرويد العنب ومنه نشأ فيرويد حشيشة الدينار. كذلك هناك من يؤكد هذا الكلام ويقول إن بعض الدول الأوروبية فيها سلالة العنب بدون أن يكون فيها زراعات حشيشة الدينار.

لا ينتقل هذا الفيرويد عن طريق البذور وبذلك لا يمكن اكتشافه فى البادرات الحديثة الناتجة عن زراعة البذور. يمكن التخلص من الفيرويد عن طريق استعمال Fragmented shoot apex culture (FSAC) حيث يمكن الحصول على شتلات خالية من الفيرويد بهذه الطريقة.



شكل رقم ٧٥ :

تتابع النيوكليتيدات والتركيب الثانوى المقترح فى كل من HSVd، HSVd - g و HSVd - c.
النيوكليتيدات المختلفة عن HSVd مشار إليها بأسهم.

ب ـ فيرويد العنب عزلة فيرويد اكسوكورتز الحمضيات

Citrus Excocortis Viroid - Grapevine CEVd - g

لقد ذكر العالم Flores سنة ١٩٨٥ أن شجيرات العنب يمكن عزل فيرويدات كثيرة منها وذكر أن بعض هذه الفيرويدات هو سلالة من فيرويد اكسوكورتز الحمضيات. باستعمال طريقة التحليل PAGE لمستحضرات أحماض نووية حصل عليها من عدة أصناف من العنب مصابة بأمراض فيرودية مختلفة، بعد تنقية هذه الفيرويدات المرافقة وجد فيها فيرويد مشابه لفيرويد اكسوكورتز الحمضيات. لقد أثبت العالم Flores et al سنة ١٩٨٥ أن هناك فيرويدات تستخلص من العنب هذه سلالة من سلالات فيرويد اكسوكورتز الحمضيات وسماها عزلة العنب-Citrus Ex-cocortis Viroid - Grapevine وتكتب باختصار CEVd - g.

اكتشاف الفيرويد:

بتحليل الأحماض النووية المأخوذة من عديد من أصناف العنب تبين وجود جزيئات من RNA صغيرة مستقيمة ودائرية والتى ينطبق عليها وصف الفيرويدات. عند حقن نباتات **Gynura aurantiaca** ببعض تحضيرات الحمض النووى المأخوذة من العنب أدى إلى ظهور أعراض نموذجية للأعراض التى يحدثها فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd وبعض الفيرويدات الأخرى، ولكن باستعمال الهجرة الكهربائية وجد أن هذه الأعراض متسببة عن CEVd لوحده. وبدراسة مقارنة للهجرة الكهربائية ظهر نموذجين للفيرويدات النموذج الأول جزيئاته شبيهة بالفيرويد أطلق عليه اسم فيرويد العنب السريع (GVd - f) وهو أسرع فى حركته فى الهجرة الكهربائية من فيرويد CEVd تحت الظروف الطبيعية أما تحت ظروف الدنترة فإنه يسلك سلوك مشابه لما يظهر فى الجيل من RNAs المستقيمة بينما لا يوجد إختلاف ملحوظ فى حالة الأشكال الدائرية.

أما النموذج الثانى فهو عبارة عن فيرويد حصل عليه من نباتات **G. aurantiaca** نتيجة لحقنها بحمض نووى من مستخلصات مأخوذة من العنب وسمى فيرويد العنب البطئ (GVd - f) . وهذا الفيرويد يهاجر مشتركاً مع CEVd فى كل نظام من أنظمة الهجرة الكهربائية المستعمل فى التحليل.

إن الفرق فى حركة الهجرة الكهربائية بين GVd - f و GVd - s يمكن أن يوضح بافتراض أن GVd - s ذو وزن جزيئى أكبر من GVd - f، إلا أن إختلاف الحجوم هذا لم يكتشف فى حالة الأشكال الدائرية تحت ظروف الدنترة، قد يكون ذلك بسبب إنخفاض حركة الأشكال الدائرية من الفيرويد تحت هذه الظروف. الاختلافات فى التركيب (البنية) عدا عن الحجم يمكن أيضاً أن يزودنا بأساس لسلوك إزدواج الهجرة الكهربائية لكل من GVd - s و GVd - f .

كذلك فإن النتائج المتحصل عليها من دراسات التهجين أظهرت أن هناك تماثل تتابع متقارب جداً بين GVd - s و GVd - f وهذا متناسق مع عدم وجود إختلاف مميز فى حجمهما وتشابه نوع الأعراض التى يحدثانها فى **G. aurantiaca** . ومن ناحية أخرى لم يمكن اكتشاف تماثل بين GVd - f وبين الفيرويد CEVd وهذا أيضاً كان متناسقاً مع عدم القدرة على الانتقال للشكل GVd - f إلى العوائل العشبية المشخصة للفيرويد CEVd وهو العائل **G. aurantiaca** .

هنا يبرز السؤال الآتى هو هل GVd - f و / أو GVd - s العامل المسبب لأمراض العنب؟؟. إن أعراض التفاف الورقة وتفلن القلف وتنقر الساق، النقطة الصفراء، التقرح، موزايك العروق ونكروزز العروق هى أمثلة للأمراض التى تصيب العنب والتى مسبباتها لم تحدد بعد وهل يفترض بأنها فيرويدات أم فيروسات. نظراً لأن بعض هذه الأمراض ينقل بالتطعيم وأعراضها تشبه الأعراض المتسببة عن فيروسات فى نباتات أخرى فقد إفترض بأنها تتسب عن فيروسات.

إلا أن الأبحاث المستمرة على العنب أثبتت أن هذ الأمراض تتسبب عن

فيرويدات وهذه الفيرويدات تتشارك مع بعضها لإحداث هذه الأعراض فقد أمكن عزل خمسة فيرويدات من نباتات العنب المصابة بهذه الأمراض. نرجع إلى السؤال الأول وهو هل GVd - f و / أو GVd - s الذى يساهم مع أخواته الفيرويدات فى إحداث المرض. نتيجة التحليل والفحص وجد أن الشكل GVd - f ليس له علاقة ببعض هذه الأعراض حيث أنه وجد فى النباتات السليمة وفى النباتات المصابة فى أصناف كثيـرة من العنـب وبالتالى ليس له علاقة بمرض التفاف الأوراق والنقطة الصفراء فى العنب. وبالتالى يمكن القول بأن GVd - s هو العامل المسبب لكثير من الأعراض التى تظهر على نبات العنب وهو المسبب لمرض النقطة الصفراء فى العنب.

دراسات تتابع النيوكليتيدات والصفات الحيوية للشكل GVd - s أثبتت أنه يتكون من (٣٧١) نيوكليتيدة وبأن صفاته متماثلة وقريبة الشبه من صفات فيرويد اكسوكورتز الحمضيات وبالتالى أطلق على هذا المسبب المرضى إسم عزلة فيرويد اكسوكورتز الحمضيات المسببة أمراض العنب.

جـ - فيرويد العنب الاسترالى

Australian Grapevine Viroid

مقدمة:

إن فيرويد العنب الاسترالى (AGVd) يتكون من ٣٦٩ نيوكليتيدة وهو فيرويد فيه صفات غريبة عن الفيرويدات النموذجية. هذا الفيرويد فيه أقل من ٥٠٪ تتابع مشابه لأى من الفيرويدات الأخرى المعروفة. بغض النظر عن أن تتابعه الكامل يمكن تقسيمه إلى مناطق كل منها بتتابع عال مشابهاً بذلك لقطع من فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd، فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd، فيرويد ندب الجلد فى التفاح ASSVd وفيرويدات النقطة الصفراء فى العنب. إن فيرويد AGVd يحتوى المنطقة المركزية المحفوظة كاملة لمجموعة فيرويد ASSVd

وبالتالى يعتبر فرداً من هذه المجموعة. يبدو أن فيرويد AGVd قد نشأ من ظاهرة إعادة الاتحاد فى كثير من RNAs الداخلة فى الفيرويدات الأخرى. إن طريقة تكاثر العنب خضرياً والتى فيها تؤخذ العقل من شجيرات العنب السابقة وهذه من التى قبلها وهكذا فمن الممكن أن يكون قد حدث إصابات متضاعفة متسببة عن عدة فيرويدات لهذه الشجيرات خلال تاريخ زراعتها الطويل وهذه الفترة الطويلة قد تكون سمحت لإعادة الاتحاد بين الفيرويدات المختلفة وأدت إلى نشوء هذا الفيرويد.

لقد عزل فيرويد العنب الاسترالى AGVd أساساً من الأعناب التى تزرع فى استراليا وهو منتشر بشكل كبير هناك وأول اكتشاف كان له فى إستراليا وبالتالى أطلق عليه اسم فيرويد العنب الاسترالى. عند وجود هذا الفيرويد فى شجيرات العنب يؤدى إلى حدوث مجموعة من الأعراض المرضية التى ذكرناها فى الفيرويد السابق، إلا أن أهم الأعراض المميزة والتى أطلقت على هذا الفيرويد هى النقطة الصفراء فى العنب. إن عزل هذا الفيرويد من الأعناب التى فيها مرض النقطة الصفراء فى العنب لا يعنى وجوده لوحده فى العنب وإنما يشترك معه فى إحداث هذه الأعراض فيرويد البقعة الصفراء فى العنب رقم ١ ورقم ٢ والتى تسمى Grapevine Yellow Speckle Viroid (GYSVd - 2 , GYSVd - 1) وكذلك يشترك معه عزلات اكسوكورتز الحمضيات CEVd - g وعزلة فيرويد تقزم حشيشة الدينار HSVd - g. يمكن تمييز هذا الفيرويد عن بقية الأربعة فيرويدات الأخرى بواسط الهجرة الكهربائية فى الجيل وكذلك بواسطة مقدرته على التناسخ فى الخيار والطماطم وعدم مقدرته على التهجين مع منقبات فيرويدات أخرى. إن التركيب الكامل للفيرويد AGVd يظهر أنه جزئ مركب طبيعياً والذى يمكن أن يكون قد نشأ من إعادة الاتحاد من فيرويدات أخرى وهذه الظاهرة معروفة بين الأحماض النووية وتسمى Recombination.

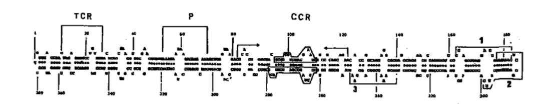
تتابع النيوكليتيدات الكامل للفيرويد AGVd:

إن تتابع النيوكليتيدات فى الفيرويد وتركيبه الثانوى المقترح يظهر فى شكل ٧٦. إن فيرويد AGVd هو جزئ دائرى من RNA يتكون من ٣٦٩ نيوكليتيدة

وهذه النيوكليتيدات موزعة كالآتى: ١٠٣ C بنسبة ٢٧,٩٪، ١١١ G بنسبة ٣٠,١٪، ٧٦ A بنسبة ٢٠,٦٪ و ٧٩ U بنسبة ٢١,٤٪. وإن نسبة C + G تساوى ٥٨٪ وهى تتشابه فى كثير من الفيرويدات. وكما هو معروف بالنسبة لكل الفيرويدات فإنه لا يشفر لأى بروتين.

إن التركيب الأولى للفيرويد AGVd يترتب بحيث يسمح بتكوين أعلى درجة من تزاوج القواعد كما فى شكل ٧٢. الشكل الناتج يكون شبه عصوى نموذجى للفيرويدات. من مجموع القواعد فإن ٦٩٪ من هذه القواعد هى أزواج والمراكز المتزاوجة تتكون من ٥٤,٧٪ GC و ٢٩,٧ AU و ١٥,٦٪ GU. عند مقارنة فيرويد AGVd مع فيرويدات أخرى مثل ASSVd الذى هو من مجموعته تبين أن AGVd يحتوى أكبر عدد من قواعد الأزواج غير المتقاطعة الممتدة وبالتالى يبدو بأنه أكثر التراكيب الثانوية ثباتاً.

كما فى جدول ٥٢ هناك إختلاف مفرد واحد فى التتابع وجد فى كلون cDNA والذى فيه الموقع رقم ٥٥ قد حذفت منه النيوكليتيدة. من الممكن أن مرور AGVd خلال نبات الخيار لتنقيته كان له تأثير تصفية فى إستبعاد تنوعات التتابع فى هذا الفيرويد، فى حين أن فيرويدات العنب الأخرى GYSVd - 1 وكذلك GYSVd - 2 فيها العديد من تنوعات التتابع.



شكل رقم ٧٦ :

التركيب الثانوى المقترح لفيرويد AGVd. المراكز المحدودة بصناديق هى المنطقة المركزية المحفوظة فى الخيط العلوى والسفلى من فيرويد ASSVd. تشير الأسهم إلى التتابع الذى يمكن أن يكون تركيب متعاكس. الأرقام ١، ٢، ٣ تشير إلى البرايمر المستعمل.

جدول ٥٢ : تعاقب ازواج القواعد فى فيرويدات مجموعة الفيرويد ASSVd .

طول منطقة ازدواج القواعد	التكرار فى الفيرويدات			
	ASSVd	GYSVd - 1	GYSVd - 2	AGVd
٤	٤	٤	٦	٦
٥	٤	٥	٥	٥
٦	١	١	٣	٣
٧	١	—	—	١
٨	—	—	—	٢
٩	١	—	—	—
١١	—	—	—	١
مجمـــوع ازواج القواعد فى المناطق المذكورة أعلاه	٥٨	٤٧	٦٧	١٠١
عدد النيوكليتيدات الكلى	٣٣٠	٣٦٧	٣٦٣	٣٦٩

تركيب النطاقات فى الفيرويد AGVd :

إن المنطقة المركزية فى الفيرويد AGVd (كما فى شكل ٧٦) تشمل جميع التتابعات المحفوظة فى مجموعة فيرويدات ASSVd . هذه المنطقة المحفوظة تتكون من ١٦ مركز فى الجزء السفلى و ١٨ مركز فى الجزء العلوى من التركيب الثانوى للفيرويد وهى إبتداءً من رقم ٩٥ إلى رقم ١١٠ فى الخيط العلوى وإبتداءً من رقم ٢٦٢ إلى ٢٧٩ فى الخيط السفلى. هناك مركزين غير متوافقين محددين فى المنطقة المحفوظة السفلية فى الفيرويد ASSVd (موقع ٢٢٩ و ٢٢٨) وكذلك فى فيرودين آخرين من هذه المجموعة، وهذا راجعاً إلى بعض الأخطاء فى طباعة

الكمبيوتر الذى استعمل فى دراسة تتابع ASSVd. وبالتالى فإن المنطقة المركزية المحفوظة كلها CCR فى الفيرويد ASSVd هى نفسها فى كل من GYSVd - 1 و GYSVd - 2 وفى AGVd.

إن التتابع المحفوظ العلوى فى الفيرويد AGVd والثلاثة عشر مركزاً المحيطية الجانبية على أربعة جوانب (٤٢ مركز) عندها القدرة لأن تعمل تزاوج قواعد مع نفس التتابع من ٤٢ مركز موجوداً فى جزئ آخر من AGVd أو فى أى منطقة من جزئ Multimeric من AGVd ليشكل تركيب متعاكس Palindromic وقد إقترح أن هذا الارتباط يشكل مواقع إنشطار لوحدة طول فى الفيرويدات. إن تتابع ال ٤٢ مركز فى AGVd والمراكز المماثلة لها فى الخيط السفلى يمكن أن تنفرد وتكون شكل صليب فى الفيرويد.

نطاقات المرضية والأطرف:

Pathogenicity and Terminal Domains

يبدأ نطاق المرضية فى هذا الفيرويد من المركز ٥٣ ويمتد إلى مركز ٧٠ فى الخيط العلوى. هذا التتابع يشابه نطاق المرضية فى الفيرويدات الأخرى. إن تتابع AAAGAAAA موجود فى نطاقات المرضية فى معظم فيرويدات تحت مجموعة B_1 وهو موجود فى الفيرويد AGVd من مركز ٥٣ إلى مركز ٦١. عند مقارنة نطاق المرضية فى فيرويد AGVd مع الفيرويدات الأخرى نجد أنه أكثر إنتظاماً فى قواعد الأزواج وفيه عروة واحدة فقط. إن ثبات تتابع أزواج القواعد فى نطاق P فى الفيرويد AGVd يتوافق مع قلة حدوث التعبيرات المرضية فى النباتات العشبية وهذه الظاهرة ملاحظة أيضاً فى فيرويد PSTVd حيث أن زيادة ثبات أزواج القواعد فى تتابع نطاق P يرتبط مع نقص الشدة المرضية للفيرويد.

أما المنطقة الطرفية اليسرى للفيرويد AGVd فهى تشمل تتابع ١٧ نيوكليتيدة من مركز ١١ إلى ٢٧ والتى تكون محفوظة فى مواقع نموذجية أو مشابهة لمعظم

الفيرويدات الأخرى. علاوة على ذلك فإن جميع الفيرويدات ذات الحجم الجزيئى الذى يقارب من ٣٦٠ نيوكليتيدة تحتوى هذا التتابع، بينما تلك التى هى أقل من ٣٠٠ نيوكليتيدة تفتقر إلى هذا التتابع. إن دور هذه المنطقة الطرفية المحفوظة TCR فى تناسخ الفيرويد والمرضية غير معروف (١٩٩٢).

مقارنة الفيرويد AGVd مع الفيرويدات الأخرى:

إن الفيرويد AGVd يظهر أقل من ٥٠ ٪ من تماثل التتابع الكلى الذى يتشابه مع أى من الفيرويدات المعروفة الأخرى. إن أعلى تتابع متشابه لوحظ هو ٤٩ ٪ يحدث بين AGVd وأى من فيرويدات مجموعة ASSVd أو CEVd. إن التماثل بين AGVd و GYSVd - 1 يشمل ٣٤ مركز متطابق فى المنطقة العلوية والسفلية من CCR والتى توجد فى كل أفراد مجموعة ASSVd. وبالتالى فإنه فى خارج CCR فإن الفيرويد AGVd فيه تماثل تتابع أعلى مع فيرويد CEVd منه مع GYSVd - 1.

مع أن تماثل التتابع الكلى بين AGVd و CEVd هو فقط ٤٩ ٪، إلا أن هناك مناطق معينة فى هذين الفيرودين فيهما تماثل تتابع تام واصطفاف هذه المناطق يكون على نفس الخط بالنظر للتركيبات الأولية لجزيئات هذين الفيرودين. إن الإستثناء الوحيد هو تتابع من ٢١ مركز والتى تشكل نصف المنطقة العلوية CCR فى الفيرويدات من مجموعة PSTVd. هذا التتابع المحفوظ يحدث على جانب اليد اليمنى من CCR السفلى فى الفيرويد AGVd.

إن الجزء العلوى من AGVd يحتوى مناطق بالإضافة إلى CCR والتى تكون غالباً أكثر قرباً وعلاقة مع التتابعات فى ASSVd. وأخيراً فإن هناك مجموعة من تسعة مراكز بين نطاق P و TCR فى الفيرويد AGVd وهى من ٣٥ ـ ٤٣ والتى توجد فى المناطق المماثلة من الفيرويد GYSVd - 1.

بالنظر إلى جميع هذه التتابعات المتماثلة، تقريباً فإن جميع تتابعات الفيرويد AGVd يمكن أن تفسر عن طريق وجود علاقة تتابع فى CEVd، ASSVd، GYSVd - 1

وفى ال CCR فى مجموعة الفيرويد PSTVd وهذا يدل على أن AGVd مركب من تتابعات مكونة من ١٢ مجموعة محددة.

د ـ فيرويدات النقطة الصفراء في العنب

Grapevine Yellow Speckle Viroids

مقدمة:

كان أول ذكر لمرض النقطة الصفراء فى العنب سنة ١٩٧٢ فى استراليا وذلك من قبل العالم Tayler. إن النقطة الصفراء مرض يصيب العنب وهو واسع الإنتشار فى المناطق المروية فى استراليا حيث يزرع معظم أنواع عنب الزبيب والخمور. تكون أعراض المرض عبارة عن نقط صغيرة وبثرات صفراء منتشرة فوق سطح الورقة، وهذه الأعراض تكون سائدة فى شهور الصيف الحارة فى النباتات المصابة. مع أن المرض شبية فى أعراضه مع الأمراض الفيروسية فى الطبيعة، إلا أنه لم يمكن عزل أجزاء فيروسية من الأنسجة المريضة وبذلك إقترح بأن هذا العامل المسبب للمرض هو فيرويد وذلك قبل العالم Bovey ورفقاه سنة ١٩٨٠ وكذلك Flores et al سنة ١٩٨٥.

إن مرض النقطة الصفراء فى العنب Grapevine Yellow Speckle Disease قد تبين بأنه يتسبب بشكل مستقل عن فيرودين مختلفين يعرفان باسم:

(GYSVd - 1) Grapevine Yellow Speckle Viroid - 1

(GYSVd - 2) Grapevine Yellow Speckle Viroid - 2

إن كلا الفيرويدين عضوين فى تحت مجموعة فيرويدات B_2 التى يمثلها فيرويد ندب الجلد فى التفاح ASSVd وفيها ٧٣٪ تماثل تتابع. إن كلا الفيرودين الأول والثانى قد اكتشفا فى الأعناب المظهرة للأعراض المرضية وغير المظهرة للأعراض فى أعناب استراليا بالإضافة لوجودهما بوضوح فى الأنسجة غير المظهرة للأعراض فى أعناب كاليفورنيا.

أولاً: فيرويد النقطة الصفراء فى العنب رقم ١

Grapevine Yellow Speckle Viroid - 1 (GYSVd - 1)

لقد عزل RNA وحيد الخيط دائرى من نباتات العنب المصابة بمرض النقطة الصفراء وسمى هذا الحمض باسم فيرويد النقطة الصفراء فى العنب رقم ١ وهو يحتوى ٣٦٧ نيوكليتيدة وعنده المقدرة على أن يكون تركيب ثانوى شبه عصوى الذى تتصف به الفيرويدات. إن هذا الفيرويد فيه ٣٧٪ تماثل تتابع مع فيرويد ندب الجلد فى التفاح ASSVd وعنده بعض تماثل التتابع مع فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd. إن تتابع فيرويد GYSVd وصف بأنه مناسب مع تراكيب النطاقات الموصوفة فى PSTVd، إلا أن هذا الفيرويد يفتقر إلى تتابع المنطقة المحفوظة فى PSTVd. بدلاً من ذلك هناك تتابع محفوظ فى المنطقة المركزية فى الفيرويد GYSVd - 1 والتى عندها الكفاءة لتشكل عروة ساق وتركيب متعاكس Palindromic ثابت مثل الذى تفعله المنطقة المركزية المحفوظة فى مجموعة PSTVd. هذه الصفات التركيبية تؤدى إلى الاقتراح بأن هناك منطقة محفوظة مركزية مختلفة لكل من GYSVd - 1 و ASSVd.

صفات الفيروید GYSVd - 1:

لقد تحدد بأن الحمض النووى المعزول من أصناف العنب المصابة بمرض النقطة الصفراء يتكون من خيط مفرد دائرى RNA. إن هذا الخيط يهاجر كخيط مفرد RNA تحت ظروف الدنترة. كما فى RNAs الدائرية الأخرى المعزولة من العنب فإن إنتاج GYSVd - 1 منخفض تقريباً فهو يعطى حوالى ١ ميكوغرام فيرويد من كل كيلوغرام نسيج ورقة.

يتكون الفيرويد من ٣٦٧ نيوكليتيدة وهى كالآتى ٥٣٪ G : C، ٢٦٪ A : U و ٢١٪ G : U وإن نسبة G + C تساوى ٦٠٪.

مطابقة الفيرويد GYSVd - 1 مع نموذج نطاقات الفيرويدات:

إن فيرويد GYSVd - 1 يمتلك ٣٧٪ تماثل تتابع بالنسبة للفيرويد ASSVd. تكون المراكز المتماثلة فى كلا الفيرودين غير عشوائية التوزيع ولكنها تحدث فى مجموعات من أزواج القواعد فى التركيب الثانوى فى كلا الفيرودين. كذلك فإن هناك أيضاً بعض التماثل بين GYSVd - 1 و ASSVd مع أفراد من مجموعة PSTVd والذى تحدد فى ثلاثة مجموعات من القواعد.

إن مقارنة التتابع بين GYSVd - 1 و ASSVd من ناحية ومجموعة PSTVd من ناحية أخرى يبين أن GYSVd - 1 يتطابق مع نموذج نطاقات الفيرويد المفترض من قبل Keese and Symone سنة ١٩٨٥ وهو يتكون من T_1، T_2 وهما نطاقى الطرف الأيمن والطرف الأيسر ويعتبران متغيران بين الفيرويدات المختلفة ثم نطاق P وهذا النطاق يتعلق بمرضية الفيرويد ثم نطاق C وهو المنطقة المركزية المحفوظة وهى ضرورية لتجهيز وتناسخ الفيرويد. نطاق V وهى منطقة عالية الاختلاف فى التتابع.

هناك مسافة ممتدة تتكون من ١٧ مركز موجودة فى منطقة T_1 من التركيب الثانوى للفيرويد GYSVd 1. لا يوجد تتابع فى المنطقة المفترضة للنطاق T_2 تتشارك مع فيرويدات من مجموعة PSTVd، ولكن هذه المنطقة محددة بواسطة إمتدادات لتتابع مشترك للفيرويدين GYSVd - 1 و ASSVd. أما نطاق P فإن هناك ١٩ مركزاً من تتابع Oligopurine فى هذا الفيرويد تقع بين مركز ٦١ و ٩٠ وهى ذات جزء غنى بالادنين يقع بين ٦٣ و ٧٣. فى التركيب الثانوى المفترض من الفيرويد GYSVd - 1 فإن التتابع الغنى بازواج القواعد من الأدنين يتركب مع تتابع U فى الخيط المقابل فى مراكز ٢٩٩ ـ ٣٠٩. أما نطاق C، فإن فيرويد GYSVd - 1 مثل فيرويد ASSVd لا يحتوى تتابع منطقة C الشائع فى جميع الفيرويدات الأخرى من مجموعة PSTVd. وعلى أية حال فإن هناك ١٦ مركز محفوظة فى منطقة شبيهة لموقع المنطقة المركزية المحفوظة فى PSTVd. هذه التتابعات تتدخل بكفاءة فى تكوين تركيبين والتى تشابه تلك التى فى منطقة C فى مجموعة PSTVd.

إن الجزء العلوى من منطقة C فى فيرويد GYSVd - 1 تستطيع بكفاءة أن تتخذ تكوين ساق عروة بستة عشر قاعدة محفوظة كلية مغطية قمة التركيب. المراكز المحيطة الجانبية بالتتابع المحفوظ كلية تشارك فى الساق فى الفيرويد. لقد إفترض أن تركيب ساق العروة يتدخل فى الانتقال بين التركيب الطبيعى للفيرويد والتركيبات الهامة فى تناسخ الفيرويد.

فى الفيرويد GYSVd - 1 هناك ٣٦ مركزاً تتدخل فى تكوين تركيب ساق العروة. هذه الستة وثلاثون مركزاً عندها المقدرة على تكوين تركيب متعاكس ثنائى مع جزئ آخر من GYSVd - 1 فى شكل مستقيم. إن هذا التركيب الثنائى المزدوج يمكن أن يتكون ضمن جزيئات GYSVd - 1 أل Multimeric. إن الستة عشر مركزاً المحفوظة تماماً تشكل القلب المركزى فى هذا الجزء الثنائى. بناءً على ذلك يمكن القول بأن الفيرويد GYSVd - 1 والفيرويد ASSVd لهما منطقة محفوظة مركزية فريدة عن بقية الفيرويدات.

أما نطاق V فإنه يمتد بين مركز ١٢٢ و ١٤٥ وهو إمتداد قصير من حلزون مكون من أوليجوبيورين وأوليجوبايرمدين.

ثانياً: فيرويد النقطة الصفراء فى العنب رقم ٢

Grapevine Yellow Speckle Viroid - 2 (GYSVd - 2)

كان هذا الفيرويد سابقاً يسمى GVd 1B وهو مثل فيرويد النقطة الصفراء فى العنب رقم ١ GYSVd - 1 يمكن أن ينتقل إلى شجيرات العنب الخالية من الفيرويدات عن طريق الحقن الميكانيكى وكل من الفيرودين يحدث أعراض مرض النقطة الصفراء فى العنب. عند تنقية الفيرويد GYSVd - 2 من أصناف العنب كما فى طريقة Rezaian et al سنة ١٩٨٨ وإجراء طرق التحليل المختلف تبين أن الفيرويد له تركيب ثانوى شبه عصوى (شكل ٧٧).

إن فيرويد GYSVd - 2 يتكون من ٣٦٣ نيوكليتيدة تتكون من ٦٨ A ، ٧٧ U ، ١٠٦ G و ١١٢ C. وبالإجمال ٦٧٪ من نيوكليتيداته أزواج قواعد وأزواج القواعد هذه ٣٣٪ A : U و ٥٥٪ G : C و ١٢٪ G : U. هناك إختلاف فى التتابع لوحظ بين كلونات cDNA للفيرويد GYSVd - 2. التغيرات كانت G → A على مواقع ٣٠٠ و ٣٢٨، U → C على المواقع ٣٤٤ و C → U على موقع ٣٦٠ وهناك حذف على موقع ٨.

إن تتابع الفيرويد GYSVd - 2 قورن مع تتابعات الفيرويدات المعروفة الأخرى باستعمال برنامج الكمبيوتر الذى وضعه Wilbur & Lipman سنة ١٩٨٣. إن درجة التشابه بين مختلف تركيب النطاقات فى الفيرويد GYSVd - 2 والفيرويدات المعروفة الأخرى فى جدول ٥٣. إن هذا الفيرويد يحتوى تتابع فى منطقته المركزية مشابه تماماً لذاك الموجود فى GYSVd - 1 و ASSVd. إن التتابعات المركزية فى GYSVd - 2 مختلفة تماماً عن تلك الموجود فى تحت مجموعة B_2 من الفيرويدات والتى تعطى زيادة فى التأكيد عن وجود إختلاف بينهما.

إن الفيرويد GYSVd - 2 قريب الشبه جداً مع الفيرويد GYSVd - 1، حيث فيه ٧٣٪ تشابه كلى معه والذى يمكن أن يتسبب عنه Cross - hybridization والذى لوحظ بين الفيرودين. إن تركيب فيرويد GYSVd - 2 يتوافق مع نموذج النطاقات المقترح من قبل Keese & Symons سنة ١٩٨٥ وفيه يمكن تحديد نطاق C، P و T_1 بسهولة. إن وجود نطاق V مشكوك فى موقعه بالضبط فى هذا الفيرويد حيث أن حلزون Oligopurine : Oligopyrimidine يحتوى على الأقل ٣ أزواج قواعد GC كما حدد فى نموذج النطاقات وهذا غير واضح فى الموقع العادى بين منطقتى C و T_2. أما نطاق P فى هذا الفيرويد فهو غنى باليورين فى الخيط العلوى وغنى باليوريدين فى الخيط السفلى والذى يؤدى إلى تماثل تتابع عال نسبياً عندما يقارن نطاق P فى GYSVd - 2 مع نطاق P فى الفيرويدات الأخرى.

إن الخيط العلوى من التتابع المركزى المحفوظ الموجود فى GYSVd - 1 و GYSVd - 2 و ASSVd هو تتابع متكرر معكوس. إن التتابع المتكرر المنقلب فى العشرة قواعد يحيط جانبياً بالخيط العلوى من التتابع المركزى المحفوظ فى GYSVd - 2 ، وإن هذه العشرة قواعد ذات التتابع المكرر المعكوس مشابهة تماماً لتتابع العشرة قواعد والتى تحيط جانبياً بالتتابع المركزى المحفوظ فى GYSVd - 1 . وعلى أية حال فإن مركز A الموجود فى موقع ٨٧ من تتابع الفيرويد GYSVd - 2 ومركز U الموجود على موقع ١١٦ من تتابع الفيرويد نفسه قد تغيرت فى GYSVd - 1 الفيرويد إلى G و C بالترتيب.

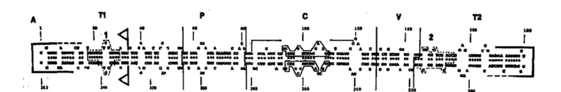
أما نطاق T_2 فى الفيرويد GYSVd - 2 فإنه بشكل عام يظهر قليل من تماثل التتابع مع نطاقات T_2 فى الفيرويدات الأخرى. وعلى أية حال هناك بعض التتابع المحفوظ بين نطاقات T_2 فى GYSVd - 2 و GYSVd - 1 و ASSVd . إن المراكز من ١٧٠ إلى ١٨٥ فى الجزء الطرفى من منطقة T_2 من الفيرويد GYSVd - 2 مكررة فى الجزء الطرفى من منطقة T_1 (مراكز ٣٥١ ـ ٦). إن التكرار فى منطقة T_1 غير كامل بسبب الثلاثة مراكز الزائدة عن ما هو موجود فى T_2 الموجودة فى مواقع ٣٥٦ ، ٣٥٧ و ٥ . إن النهاية 3` فى كل تتابع مكرر محاطة جانبياً بواسطة منطقة غنياً باليوردين . إن التكرار المباشر على نهايات مناطق T ليس واضحاً فى الفيرويدات الأخرى.

هناك مجموعة من التتابع فى منطقة T_1 من الفيرويد GYSVd - 2 والتى هى محفوظة وموجودة فى موقع مماثل فى كل من GYSVd - 1 و ASSVd ، وعلى أية حال فإن مواقع ٣٣٩ فى GYSVd - 2 هو مركز فى ASSVd . وإن المراكز من ١٨ إلى ٣٠ هى أيضاً محفوظة فى عدد من فيرويدات مجموعة PSTVd .

إن الفيرويد GYSVd - 2 فيه ٤٩ ٪ تماثل تتابع مع فيرويد النبات الذكري فى الطماطم TPMVd . إن تماثل التتابع العال بين TPMVd و GYSVd - 2 فى

الأصل بسبب مجموعة من ٦٩ مركز فى نهاية اليد اليسرى من الفيرويد GYSVd - 2 والتى هى مماثلة إلى حد كبير مع المنطقة المشابهة لها فى نهاية اليد اليسرى من الفيرويد TPMVd. وبشكل عام فإن نطاق T_1 فى الفيرويد GYSVd - 2 فيه تماثل تتابع عال مع نطاقات T_1 فى الفيرويدات PSTVd ، TPMVd، CEVd. وهذا يزودنا باثباتات أكثر لأهمية إعادة الاتحاد فى RNA ودوره فى تطور الفيرويد.

إن العالم Keese & Symons قد ذكرا سابقاً ملاحظات عن إعادة الاتحاد فى الحمض النووى RNA بين أفراد فيرويدات تحت مجموعة B_1 التى يمثلها فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وهذه الملاحظات تنطبق على الفيرويد GYSVd - 2.



شكل رقم ٧٧ :

تتابع النيوكليتيدات والتركيب الثانوى المقترح لفيرويد GYSVd - 2. يوضح كذلك أماكن النطاقات. الأسهم تشير (مرسومة فوق) المراكز المتكررة المقلوبة والتى تحيط جانبياً بالمنطقة المركزية المحفوظة [محصورة فى خطوط سوداء غامقة]. الصناديق المكونة من نقط رقم ١ و ٢ تحتوى المراكز والتى هى أيضاً محفوظة فى فيرويد ASSVd و GYSVd - 1. التتابع المتكرر المباشر موجود فى الأجزاء الطرفية من T_1 و T_2 فى الفيرويد GYSVd - 2 ومشار إليها بخطوط سميكة، أما المناطق الغنية بـ U والتى تلتف جانبياً على 3َ فى كل تكرار يشار إليها بشرطات سميكة، الأعلام تدل على حدود تتابع $GYSVd_2$ والذى يكون دائماً نموذجى كما هو موجود فى فيرويد TPMVd.

جدول ٥٣ : يبين تماثل التتابع بين نطاقات الفيرويدات المختلفة.

الفيرويدات المستعملة فى المقارنة المزدوجة	% تماثـل تتابـع					
	النطـــاقـــات					
١ ٢	T_1	P	C	V	T_2	الكلى
GYSVd - 1 - GYSVd - 2	٨٦	٦١	٨٦	٥٣	٤١	٧٣
ASSVd - GYSVd - 2	٤٠	٥٢	٥٩	—	٣٨	٤٦
GYSVd - 1 - ASSVd	٣٣	٤٦	٥٣	—	٤٥	٤٢
GYSVd - 2 - HLVd	×	×	٣٠	×	×	٣٨
ASSVd - HLVd	×	×	٢٢	×	×	٣٠
GYSVd - 1 - HLVd	×	×	٢٨	×	×	٤٢
GYSVd - 2 - PSTVd	٤٨	٥٧	٣١	—	٢٧	٤٢
ASSVd - PSTVd	٥٢	٤٦	٢٦	٢٤	١١	٤٢
GYSVd - 1 - PSTVd	٥٠	٤٦	٢٦	—	٢٦	٣٧
HLVd - PSTVd	×	×	٥٣	×	×	٤٤
GYSVd - 2 - TPMVd	٦٦	٥٩	٢٥	—	٣٦	٤٩
ASSVd - TPMVd	٤٦	٤٦	٣٢	—	٢٨	٣٦
GYSVd -1 - TPMVd	٥٦	٤٢	٢٣	—	٣٦	٤٤
HLVd - TPMVd	×	×	٥٤	×	×	٤٥
GYSVd - 2 - CSVd	٣٠	٣٨	٢٥	—	٢٤	٣٧
ASSVd - CSVd	٤٦	٤٤	٣٤	—	٢١	٤٤
GYSVd - 1 - CSVd	٣٠	٥٥	٢٢	—	٣٣	٤٠
HLVd - CSVd	×	×	٦١	×	×	٣٧
GYSVd - 2 - CEVd	٥٩	٥٠	٢٥	—	٣٣	٤٠
ASSVd - CEVd	٤٣	٤٠	٢٩	٢٨	٢٧	٤٠
GYSVd - 1 - CEVd	٥٢	٥٥	٢٥	—	٢٥	٤٠
HLVd - CEVd	×	×	٦٩	×	×	٤٠
GYSVd - 2 - TASVd	٤٦	٥٠	٢٦	—	٣٨	٤٢
ASSVd - TASVd	٤٣	٥٢	٣٠	—	٣٤	٤٠
GYSVd - 1 - TASVd	٤٩	٥٥	٢٦	—	٣٦	٤٠
HLVd - TASVd	×	×	٦٨	×	×	٤٧
GYSVd - 2 - CCCVd	—	—	٢١	—	٧	٣٤
ASSVd - CCCVd	—	٣١	٢٨	—	٣٣	٣١
GYSVd - 1 - CCCVd	١٩	٢١	٢٧	—	٢٨	٣٠
HLVd - CCCVd	×	×	٦٠	×	×	٥٠
GYSVd 2 - HSVd	٢٠	٤٠	٢٤	—	١٦	٣٤
ASSVd - HSVd	٢٤	٤٠	٢٣	—	٢٦	٣٦
GYSVd 1 - HSVd	٢٨	٥٠	٢٣	—	٢٥	٣٨
HLVd - HSVd	×	×	٤٥	×	×	٤٢

(—) = لم يحدث قياس. (×) المنطقة المركزية المحفوظة هى المنطقة الوحيدة التى حددت فى HLVd واستعملت فى المقارنة.

مقارنة بين GYSVd - 1 و GYSVd - 2 :

بدراسة تتابع الفيرودين المذكورين أعلاه كل على حدة تبين أن كل منهما يحتوى على تتابع مركزى متماثل وكلاهما موجود على شكل تركيب شبه عصوى وكلاهما ينتمى إلى تحت مجموعة B_2 التى يمثلها ASSVd . أما بالنسبة لحيوية كل من الفيرودين، فقد وجد أن كلا الفيرودين ينتقل إلى الطماطم أو الخيار. إن جدول رقم ٥٤ يبين حيوية كل من الفيرودين على بادرات العنب من حيث التناسخ وأحداث أعراض ظاهرية والانتقال.

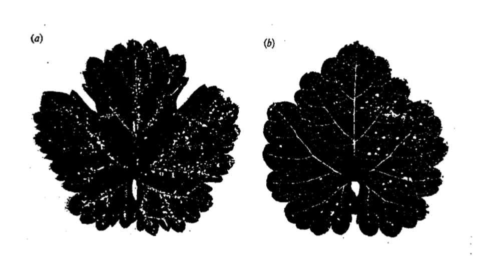
إن استعمال نسخاً مبنية من RNA فى المعمل أظهر نسبة منخفضة فى إحداث الأعراض على النباتات، هذا يدل إما على تلوث اللقاح أثناء التحضير، أو الحقن بطريقة غير محكمة أو غير متحكم بها. كما وأنه ليست جميع النباتات المحقونة بالفيرورودين أصبحت مصابة، وهذا قد يكون بسبب الاختلافات الوراثية للنباتات المختبرة حيث أنها مفتوحة التلقيح أى أن بادراتها مختلفة وراثياً أو إلى كفاءة طريقة الحقن الميكانيكى، كما أنه يمكن تفسيـر هذه النتائج بوجود تنوعات تتابع فى الفيرويدات.

تعبيرات الأعراض :

كما هو ملاحظ فى جدول رقم ٥٤ فإن واحداً من أربعة نباتات حقنت بنسخ GYSVd - 1 موجب ذو معنى Dimeric تحتوى monomeric GYSVd - 1 . إن كلاً من GYSVd - 1 و GYSVd - 2 يسبب أعراض مرضية على شكل نقط خضراء مصفرة دالة على مرض النقطة الصفراء الشديد والتى تلاحظ على طول العروق فى الورقة فى بعض الأوراق من النبات، وهذا يزودنا بدليل مباشر على أن كلا من الفيرويدين يسبب مرض النقطة الصفراء فى العنب بمفرده أو مشتركاً مع الآخر ولكن بملاحظ شكل ٧٨ نجد أن الأعراض المتكونة على النباتات المحقونة بالفيرويد GYSVd 2 تكون أقل شدة من تلك المتسببة عن GYSVd - 1 وتكون مبعثرة كثيراً على سطح الورقة.

جدول ٥٤: حيوية الفيرويدات GYSVd - 1 و GYSVd - 2 المحقونة فى نباتات عنب خالية من أى مسبب مرضى.

	نوع اللقاح	كمية اللقاح فى كل نبات	عدد النباتات المحقونة	عدد النباتات المتكشف عليها		عدد النباتات التى تظهر عليها أعراض مرض النقطة الصفراء
				GYSVd - 1	GYSVd - 2	
١ـ	GYSVd - 1 نقى	٦ نانوغرام	١٦	٨	ـ	١
٢ـ	مخلوط أحماض نووية فيها الفيرويد GYSVd - 1	٣٤ نانوغرام	٥	٤	ـ	٢
٣ـ	GYSVd - 2 نقى	٦ نانوغرام	٩	ـ	٧	٤
٤ـ	GYSVd - 1 + GYSVd - 2	٦ نانوغرام	٥	٣	٤	١
٥ـ	نسخة موجبة GYSVd - 1	٢٠٠ نانوغرام	٤	١	ـ	١
٦ـ	نسخة سالبة GYSVd - 2	٢٠٠ نانوغرام	٣	ـ	ـ	ـ
٧ـ	كنترول	ـ	٩	ـ	ـ	ـ



شكل رقم ٧٨ :

أعراض مرض النقطة الصفراء على أوراق من العنب محقونة. a = أعراض شديدة متكونة من الفيرويد GYSVd - 1 أما b = أعراض خفيفة متكونة عن الفيرويد GYSVd - 2 .

أما النباتات المحقونة بنسخ Dimeric GYSVd - 1 سالب ذو معنى لم يتكشف فيها الفيرويد GYSVd - 1 ولم يظهر عليها أعراض. عند ترك جميع النباتات المحقونة وغير المحقونة تحت ظروف الصيف الطبيعية لوحظت تعبيرات الأعراض المرضية لمرض النقطة الصفراء فى العنب واضحة جداً. وبشكل عالم يمكن القول بأن مرض النقطة الصفراء فى العنب تزداد شدة أعراضه بزيادة نشاط أى من الفيرودين وإن أعراض المرض على النباتات المحقونة تتراوح من شئ بسيط من البقع الصفراء الكرومية إلى حزم خضراء مصفرة على طول العروق. هذه الأعراض مشابهة للأعراض التى تحدث فى الحقل طبيعياً والتى تكون مختلفة الشكل واللون ضمن النبات الواحد من نفس النوع المزروع من العنب وبين المواسم المختلفة.

كذلك لقد وجد أن GYSVd - 1 ينتشر فى جميع زراعات العنب فى أستراليا وحتى فى النباتات التى لا تظهر أعراض مرض النقطة الصفراء فى العنب. أما فيرويد GYSVd - 2 فإنه يوجد حيث يوجد GYSVd - 1. وهناك استثناء حالة واحدة وهى النباتات التى أعيد تكاثرها من زراعة أجزاء من قمة الفرع فى مزرعة نسج حرارتها ٣٥ْم. هذه النباتات تظهر عليها أعراض مرض النقطة الصفراء وتحتوى GYSVd - 1 لوحده ولا تحتوى GYSVd - 2. وعلى أية حال فإن تكاثر فيرويد GYSVd - 2 يكون مع ذلك منفصلاً عن تكاثر الفيرويد GYSVd - 1 حيث أنهما يمكن أن يتكاثرا مستقلين فى نباتات العنب.

يمكن الحصول على نباتات عنب خالية من الفيرويدات عن طريق إنتاج شتلات من مزارع القمة النامية حيث يؤخذ طول ٠,١ ـ ٠,٢ مليمتر من قمة فرع النبات تحتوى كتلة القمة النامية مع مبادئ ورقتين قميتين وتزرع فى المعمل حسب نظام مزارع النسج. يتكشف على هذه الأجزاء جذر وساق ثم يتبع معها جميع الإجراءات اللازمة للنمو حتى تصبح بادرة هذه البادرة تكون خالية من الفيرويد.

ثانياً : فيرويدات تحت مجموعة B3

فيرويدات الكوليس

Coleus Viroids

مقدمة :

نبات الكوليس **Coleus** من نباتات الزينة يتبع العائلة الشفوية (Lamiaceae) أو Labiatae، نبات زينة له أوراق حمراء اللون مبرقشة. تنتشر زراعة هذا النبات فى كل من البرازيل، كندا، اليابان، ألمانيا والولايات المتحدة الأمريكية ويأخذ ترتيب رقم عشرة فى شهرته النباتية فى الحدائق فى أمريكا الشمالية. إن الصنف Amarelo هو أكثر الأصناف المزروعة عرضة للإصابة بالأمراض الفيرويدية تحت ظروف الحقل العادية وهو لا يظهر أعراض مرضية مرئية وذلك لأن لون الأوراق أصفر. أما الأصناف الأخرى مثل Frilled Fantasty فتظهر عليه أعراض الإصابة الفيرويدية على شكل شحوب الأوراق، كما يؤثر الفيرويد على نسبة الإنبات فى البذور ويزيدها وقد تزيد نسبة الإنبات فى البذور المصابة ٣٥٪، كما أن البذور المصابة بالفيرويد تنبت قبل البذور السليمة بحوالى ثلاثة أيام. ليس للفيرويد تأثير على حجم الورقة ولا على عدد الأوراق ولا على طول النباتات المصابة. أما فى الأصناف الأخرى تكون الأعراض على شكل صبغات أرجوانية على الأوراق. هناك أصناف

أخرى تكون حاملة للفيرويد بدون ظهور أعراض مرئية. يمكن اكتشاف الفيرويد فى النبات بعد ٢ ـ ٣ أسابيع من الحقن.

أولى الأمراض الفيرويدية على الكوليس لوحظت فى البرازيل سنة ١٩٨٥ وذلك من قبل العالم Fonseca et al وذكر أول فيرويد يصيب الكوليس وكذلك وصفه العالم Lebowitz سنة ١٩٨٥ أثناء عمله على تربية نباتات الكوليس. أول فيرويد ذكر على الكوليس سمى فيرويد الكوليس الأصفر Yellow Coleus Viroid وسمى بهذا الاسم لأن الفيرويد كان أول مصدر له هو الصنف Amarelo وهو يعنى باللغة البرتغالية الأصفر، وبالتالى يصاب الصنف بالفيرويد ولا تظهر عليه أعراض الإصابة التى هى الشحوب الأصفر فكان الفيرويد متخصص مع هذا الصنف الأصفر ولكن بعد ذلك تبين أن جميع النباتات فى الجنس كوليس تصاب بهذا الفيرويد فى البرازيل وحيـث أن الفيرويد إنتشـرت إصابته فى أصناف عديدة أصبح الفيرويد عام وسـمى فيرويد أصفرار الكوليس (CYVd) Coleus Yellow Viriod . ولقد ظهر هذا الفيرويد فى كندا سنة ١٩٩٠ على نباتات الكوليس نتيجة إنتقاله من البرازيل أو الولايات المتحدة ولقد درس دراسة وافية فى كندا.

وفى سنة ١٩٩٠ ذكر العالم Spiker et al وجود فيرويد فى نبات Colues blumi فى ألمانيا وأخذ اسم مؤقت هو Coleus blumi Viroid 1 (CbVd - 1) ولا يزال هذا الفيرويد تحت التجربة والدراسة.

أ ـ فيرويد إصفرار الكوليس

(CYVd) Coleus Yellow Viroid

مقدمة :

درس هذا الفيرويد دراسة وافية فى كندا وقد إتفق الباحثون على أن هذا الفيرويد الذى فى كندا هو نفسه الذى ظهر فى البرازيل ويمكن أن يكون الفيرويد قد دخل كندا عن طريق البذور المصابة المستوردة من أمريكا خاصة منطقة كوستاريكا حيث

تتراوح الإصابة فى أمريكا بنسبة ١٦ ـ ٦٨ ٪. وبسبب أن نباتات الكوليس فى كندا أصلها من بذور متحصل عليها من اليابان وأقطار أوروبا، أجريت محاولات لتحديد فيما إذا كان الفيرويد قد إنتقل خلال بذور الكوليس.

ينتقل الفيرويد من نباتات الكوليس إلى نباتات الريحان **Ocimum sanctum** بالطرق الميكانيكية والتطعيم. البذور الناتجة من نباتات الكوليس المصابة والمختبرة بواسطة طريقة R - PAGE ظهر أنها تحتوى الفيرويد. وكذلك فإن الفيرويد موجود فى البذور الساكنة حوالى ٣٢٥ ميكوغرام فى كل بذرة، كذلك فإن البذور المنبتة حديثاً تحتوى على الفيرويد. تتراوح معدلات الانتقال فى النبات من ٧١,٤٪ فى النموات الحديثة من البذور إلى ٦٧,٣ ٪ فى البادرات.. يوجد الفيرويد فى أجزاء الزهرة وفى إندوسبيرم بذور الكوليس ولا يوجد فى غلاف البذرة. من بين ١٦ جنس من نباتات الزينة التى إختبرت لمعرفة قابليتها للإصابة بفيرويد إصفرار الكوليس تبين أن جنسين فقط قابلان للإصابة بالفيرويد هما جنس **Colous** وجنس **Hypocyrta**. كذلك إختبرت خمسة أصناف من الكوليس تنتشر زراعتها فى الحدائق لمعرفة قابليتها للإصابة بالفيرويد وهذه الأصناف هى ـ الأخضر ـ الأرجوانى ـ الأحمر ـ المخملى (القطيفى) والقرمزى فوجد أن هذه الأصناف كلها قابلة للإصابة بالفيرويد بإستثناء الصنف الأخضر فقط الذى لا يصاب.

إنتقال الفيرويد:

ينتقل الفيرويد ميكانيكياً وبالتطعيم إلى البادرات ويمكن اكتشافه فى البادرة بعد ثلاثة أسابيع من الحقن ولكن يكون التركيز منخفض فيها، يزداد التركيز بتقدم العمر ويصل إلى أعلى مستوى له بعد خمسة أسابيع من الحقن. كذلك يمكن نقل الفيرويد بالتطعيم على نوع واحد من نباتات الريحان **O. sanctum** وكانت نسبة نجاح الإنتقال ١٣ ٪. أما الانتقال بالطريقة الميكانيكية على بادرات الريحان كانت بنسبة نجاح ١٦ ;٢٩ ٪. عند نقل الفيرويد بالتطعيم فإن النباتات المطعمة كان وجود

الفيرويد فيها فى فرعين فقط من بين ستة فروع، هذا يدل على التوزيع غير المنتظم للفيرويد فى النبات. وكذلك فإنه عند حقن البادرات الصغيرة بالفيرويد لم يظهر على هذه البادرات أعراض بعد ٣ أسابيع ولكن ظهرت الأعراض بعد ٨ ـ ١٠ أسابيع من الحقن. لم يكن هناك أعراض مرئية على النباتات المصابة. كذلك لم يمكن نقل الفيرويد إلى البطاطس أو الطماطم أو S. sinensis بواسطة التطعيم أو الحقن الميكانيكى.

طبيعة الفيرويد:

يتكون فيرويد الإصفرار فى الكوليس Coleus Yellow Viroid (CYVd) من حمض نووى RNA أحادى الخيط ويكون فى الهجرة الكهربائية أسرع من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس. أما عن إنتشار الفيرويد فى نبات الكوليس، فقد وجد أن الفيرويد يمكن اكتشافه فى الصنف الأرجوانى، القرمزى، القطيفى فى كل من أجزاء الزهرة، النموات الحدثة والأفرع المختلفة من نبات الكوليس جدول ٥٥. وكذلك فإن بذور هذه الأصناف الثلاثة تحتوى فيرويد. أما محتويات البذرة من الفيرويد، فقد وجد أن الصنف الأرجوانى يحتوى فيرويد فى البذور الكامنة (بنسبة ١٦ بذرة من ٢٤ بذرة) ٦٦,٦٪ من البذور تحتوى فيرويد. أما الصنف القرمزى والأخضر والقطيفى تنخفض فيها نسبة الفيرويد حتى تصل إلى الصفر فى الصنف الأخضر. أما بالنسبة لغلاف البذرة فلم يكتشف فيه الفيرويد فى أى صنف من أصناف الكوليس. أما الأندوسبيرم والجنين فيوجد فيهما الفيرويد فى الصنف الأرجوانى فقط بنسبة ٩٠٪ من البذور المختبرة. كذلك فإن وجود الفيرويد فى البذور المنبتة كان فقط فى الصنف الأرجوانى بنسبة ٧١,٤٢٪. أما عن وجود الفيرويدات فى البادرات كان أيضاً فى الصنف الأرجوانى فقط بنسبة ٦٧,٣٤٪.

جدول ٥٥ : توزيع الفيرويد فى النباتات الناتجة من تكاثر خضرى.

أجزاء النبات	الأصناف المختبرة. عدد النباتات الموجبة للاختبارعلى عدد النباتات المختبرة			
	القطيفى	القرمزى	الارجوانى	الأخضر
الفروع الحديثة	٢/٢	٤/٤	٢/٢	صفر/١
الأغصان	٧/٧	٥/٥	١٢/١٥	—
سبلات الأزهار	١/٢	٢/٢	٢/٢	صفر/٢
بتلات الأزهار	١/٢	٢/٢	٢/٢	صفر/٢
متوك الأزهار	١/٢	٢/٢	٢/٢	صفر/٢
عضو التأنيث فى الزهرة	١/٢	٢/٢	٢/٢	صفر/٢
البذور الساكنة	٣/٥	٢/٥	٤/٥	صفر/٥

لم يثبت وجود الفيرويد فى بذور الريحان. إن كمية وجود الفيرويد فى بذور الكوليس تقدر بحوالى ٣٢٥ ميكوغرام فى كل بذرة وهذه النسبة العالية فى البذور تجعل من السهل اكتشافه ودراسته فيها.

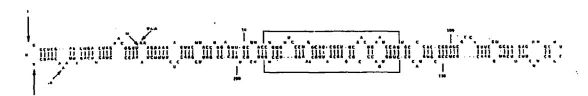
ب ـ فيرويد كوليس بليومى رقم ١

Coleus Blumei Viroid - 1

إن دراسة تتابع النيوكليتيدات الكامل فى فيرويد اصفرار الكوليس المعزول من **Solenostemon scutellarioides** أظهر أن هذا الفيرويد يتكون من ٢٤٨ نيوكليتيدة والتى تأخذ شكل عصوى فى التركيب الثانوى للفيرويد عندما تنثنى بأقل طاقة حرة. إن مقارنة تتابع فيرويد إصفرار الكوليس مع فيرويد كوليس بلومى رقم ١ (CbVd - 1) المعزول فى ألمانيا بين أن هذين الفيرودين بينهما علاقة قريبة جداً. إن الإختلافات بين الفيرودين موجود فى ثلاثة مواقع فقط هى: الموقع الأول فى مركز ٢٥ حيث تزال منه قاعدة U، والموقع الثانى هو مركز ٢٦ حيث تستبدل

قاعدة U وتحل محلها قاعدة A. أما الموقع الثالث فهو مركز ٢٤١ حيث تغرز قاعدة A. هذا يعنى أن الفيرودين فيها نفس عدد النيوكليتيدات ٢٤٨ والاختلاف فى ثلاثة مواقع فقط ولقد صنف هذين الفيرودين فى تحت مجموعة B_3 من الفيرويدات.

إن فيرويد إصفرار الكوليس (CYVd) كان أول وصف له على أنه فيرويد كامن فى نبات **S. scutellarioides** وهذا الاسم مرادف لاسم **Coleus blumei** فى البرازيل. ولقد تم إختبار هذا الفيرويد الموجود فى البرازيل والموجود فى كندا فوجد أنهما فيرويد واحد. أما فيرويد كوليس بلومى (CbVd - 1) فقد عزل من نفس النبات **S. scutellarioides** فى ألمانيا ودرس ترتيب نيوكليتيداته بواسطة Spiker **et al** سنة ١٩٩٠ ووجد أنه مماثل لفيرويد إصفرار الكوليس فى حجم الجزئ وأن التتابع الكامل للتركيب الثانوى للفيرويد فى شكل ٧٩. وبتحليل التتابع وجد أن الحمض النووى RNA للفيرويد CYVd يتكون من ٢٤٨ نيوكليتيدة بنسبة G + C إلى A + U تساوى ١,٢٣. وأن نسبة ٧١٪ من النيوكليتيدات فى أزواج قواعد وهى ٥٤ زوجة من G مع C و ٢٩ زوج من A مع U و ٥ زوج من G مع U وأن التركيب الثانوى لهذا الفيرويد الذى حدد حسب ما ذكر Zuker **et al** سنة ١٩٨٩ يكون لولبى (حلزونى) بشكل عصوى مشابه لبقية الفيرويدات الأخرى. عند مقارنة تتابع نيوكليتيدات الفيرويد CYVd مع الفيرويد CbVd - 1 تبين أنهما متشابهان بنسبة ٩٨,٩٪ من تزاوج النيوكليتيدات، وأن الاختلاف فى ثلاثة مواقع كما ذكر سابقاً. كذلك وجد أن الطفرات كلها تتواجد فى جانب جزء اليد اليمنى من جزئ الفيرويد، وإن اختلاف تتابع النيوكليتيدات الذى هو ١,١٪ بين تركيب جزيئى الفيرويدين لا يسبب أى إختلاف معنوى فى الشكل الثانوى للفيرويدين. إن شدة القرب والتشابه بين الفيرودين يؤدى إلى القول بأن الفيرودين إما نشأ من مكان جغرافى واحد أو خرجا من عمليات تطور متشابهة الأصل.



شكل رقم ٧٩ :

رســـم يبـيــن ترتـيـب النيوكليـتيدات والتـركـيب الثانـوى للفيرويـد CYVd المـعزول مـن *S. scutellarioides*. النيوكليتيدات المختلفة الملاحظة بين الفيرويدين CYVd و CbVd - 1 مشار إليها بالأسهم. المنطقة المحاطة بمستطيل هى المنطقة المحفوظة المركزية.

الفصل السابع

فيرويدات مجموعة A
تحت مجموعة ASBVd

١ ـ مرض ضربة الشمس فى الأفوكادو
Avocado Sunblotch Disease

مقدمة:

يسمى نبات الأفوكادو باللغة العربية الفصحى باسم الزبدية ونظراً لعدم شيوع هذا الاسم العربى فإننا نستعمل الاسم الحرفى الأجنبى وهو افوكادو.

لوحظت أعرض مرض ضربة الشمس فى الافوكادو سنة ١٩٢٨ وكان يعزى إلى مسبب فيروسى ولقد انتشر فى كاليفورنيا منذ سنة ١٩٣١ ولقد وصف أعراضه Horne & Parker وقالا إن مرض ضربة الشمس مرض فيروسى خطير يصيب نبات الافوكادو **Persea americana**. استمرت الأبحاث على هذا المرض لغاية سنة ١٩٦٢ وأكدت الأبحاث أنه مرض يتسبب عن فيرس وإن هذا الفيرس ينتقل بالتطعيم وبالبذور، إلا أنه لم يذكر أية صفة أخرى عن هذا الفيرس ولم يمكن عزله أو دراسة صفاته وذلك لصعوبة العزل وبقاء المسبب حياً. وبقى الحال على ما هو عليه من هذا الاعتقاد حتى سنة ١٩٧٠ حيث ظهرت أعراض لهذا المرض في استراليا، وفى هذه الفترة كان فجر علم جديد للفيرويد قد إفتتح من قبل

العالم Diener فتشكلت ثلاثة مجموعات من العلماء فى استراليا لبحث ودراسة هذا المرض وكانت هذه المجموعات تتكون من :ـ

المجموعة الأولى Peter Palukaitis et al

المجموعة الثانية J.L. Dale and R. N. Allen

المجموعة الثالثة Mohamed Ali and Wayne Thomas

أجريت الدراسات على مسبب مرض ضربة الشمس فى الافوكادو بأن عزلت جميع الأحماض النووية منخفضة الوزن من الأشجار المصابة والأشجار السليمة، وتبين أن مسبب المرض هو حمض نووى ذو وزن جزيئى (٦ ـ ٧) × ١٠^٤ دالتون ووصف بأنه ذو شكل دائرى ومقاوم للتثبيط بالحرارة، وكان يعزل من بعض الأشجار مع أنها لا تظهر أعراض وسميت حاملة للمسبب Carrier وغير مظهرة للأعراض Symptomless. ولقد تبين أن مسبب مرض ضربة الشمس فى الافوكادو ذو وزن جزيئى أصغر من الوزن الجزيئى لفيرويد تقزم الأقحوان وفيرويدات الحمضيات وإن التحليل باستعمال طريقة التهجين وباستعمال cDNA معلم بالفسفور المشع دل على أن هذا المسبب يتكون من RNA أحادى الخيط ولقد أمكن اكتشاف المسبب بعملية التحليل السابقة. ولقد تأكد أن مسبب المرض موجود فى ١٢ شجرة من الافوكادو حيث أعطت نتيجة إيجابية للفهرسة وللاختبارات البيولوجية لمرض ضربة الشمس. إن العلاقة الكاملة بين مرض ضربة الشمس ووجود مسبب المرض دل على أن إختبار تهجين cDNA يمكن أن يستعمل فى فهرسة هذا المرض وإن إجراءات الكشف هذه تحتاج ٥ أيام، أما إجراءات الكشف بالطرق البيولوجية تحتاج سنتين.

إن مستوى مسبب مرض ضربة الشمس فى مستخلص الأحماض النووية المنقى جزئياً من عدد مختلف من مصادر أوراق الافوكادو المصابة بالمرض يختلف (مثلاً حوالى ١٠٠٠٠ جزء) من ٢,٪ إلى ٢ × ١٠^-٥٪ بالوزن وإن الحد المنخفض

الممكن اكتشافه بواسطة إختبار التهجين يقدر بحوالى١٠-٥ ٪ بالوزن وهذا يساوى على الأقل١٠^٣ أكثر حساسية من اكتشاف المسبب المرضى بواسطة PAGE لمستخلص الحمض النووى من الورقة.

بعد هذه النتائج استطاعت المجموعات الثلاثة المكلفة بدراسة المرض من إثبات أن المرض يتسبب عن فيرويد وذلك سنة ١٩٧٧ وسمى هذا الفيرويد باسم فيرويد ضربة الشمس فى الافوكادو Avocado Sunblutch Viroid ويكتب باختصار (ASBVd).

الأعراض:

تظهر أعراض مرض ضربة الشمس فى الافوكادو على السيقان والفروع الخضراء للنباتات المصابة على شكل خطوط صفراء اللون كما تظهر على الثمار خطوط صفراء إلى حمراء اللون. الأعراض التى تظهر على السيقان والثمار هى الشائعة ومن السهل تمييزها. غير أن الأوراق قد يعتريها تشوه بسيط وابيضاض العروق وإصفرار وتظهر فى مراحل أخرى من الإصابة أوراق متبرقشة. الأشجار المصابة تتدلى فروعها وتتقزم أحياناً.

ولقد ذكر Thomas & Mohamed سنة ١٩٧٩ أن المرض فى استراليا يحدث بمظهرين، المظهر الأول أشجار تظهر عليها أعراض مميزة على الثمرة والقلف وإن نسبة بسيطة ٢ ـ ٥ ٪ فقط من ثمار هذه الأشجار يكون فيها بذور تحمل مسبب المرض. أما المظهر الثانى فهو عبارة عن أشجار تكون حاملة للمرض وغير مظهرة للأعراض وتسمى حاملة أو ناقلة بدون أعراض Symptomless Carriers. هذه الأشجار لا يظهر عليها أعراض سواء على الثمرة أو القلف ولكن الأعراض سوف تتكشف على القلم الذى يستعمل طعماً عليها. إن ٨٦ ـ ١٠٠ ٪ من الثمار المأخوذة من هذه الأشجار الحاملة بدون إظهار أعراض، تحمل مسبب المرض، ومع ذلك فإن البادرات من هذه البذور تكون أيضاً حاملة للمرض بدون أعراض إلا أنه

عند تطعيمها بقلم سليم (مأخوذ من أشجار سليمة) فإن نموات هذا القلم سوف يتكشف عليها أعراض المرض.

وبشكل عام يمكن تمييز أعراض المجموع الخضرى على شكل نوعين من الأعراض المرئية، النوع الأول تبرقش الأوراق وتلونها بدرجات مختلفة من الأخضر حتى الأصفر وهذا العرض يتسبب عن سلالة أو تنوع معين. والنوع الثانى إبيضاض عروق الأوراق حيث يظهر حامل الورقة والعرق الرئيسى والتفرعات الجانبية له بيضاء وقد يحدث تشوه فى قمة الورقة أو قاعدة النصل، وهذا العرض يتسبب أيضاً عن سلالة أو تنوع آخر وسوف نتكلم بالتفصيل عن هذه التنوعات (السلالات) فيما بعد إن شاء الله.

أما بالنسبة للبلاستيدات الخضراء فيظهر فيها عدم تعضى كامل وتوقف تام كلية فى المناطق الصفراء أما المناطق الخضراء تستمر سليمة عادية. بالفحص الميكروسكوبى تبين أنه فى المناطق الصفراء ينخفض ترتيب الجرانا Granas rear-rangement فى نصل الورقة ويظهر إنتفاخ فى العضيات ويتكون فجوات ويتواجد قليل من Paramural bodies فى الخلايا السليمة ولكن يتكون منها الكثير فى المناطق الصفراء ويتغير تعضيها الداخلى.

تعاقب تكشف الأعراض بعد الحقن بأنسجة مصابة بضربة الشمس:

THe Progression of Symptoms Development After Ioculation With Sunblotch - infected Tissues

إن تثبيط إنتشار الفيرويد ضمن نسيج ورقة مظهرة أعراض الابيضاض وارتباطه فى حركة غير محددة فى كل من الأنسجة المبرقشة والحاملة للفيرويد بدون أعراض يؤدى إلى القول باحتمال حدوث إنعزال فى تجمعات الفيرويد وتكوين تنوعات، هذه التنوعات المفترضة لفيرويد ASBVd يمكن أن تكون ظهرت عن طريق التفاعل مع العائل.

إن إنعزال تنوعات ASBVd الذى يحدث فى الافوكادو يمكن أن يكتشف أو يحدد بواسطة أعراض مميزة ومحددة. نظراً لأن إنتقال مرض ضربة الشمس بواسطة مستخلصات الأنسجة بالإضافة إلى الفيرويد النقى صعب جداً ويحصل عليه بصعوبة وغير متوقع، لذا يلجأ إلى استعمال نسيج مصاب ويزرع فى النبات (نوع من التطعيم)، وبالتالى فإن أية تأثيرات تحدث بواسطة تنوعات أو عزلات (أى أنواع للفيرويد) ذات التركيزات المنخفضة من تجمعات ASBVd مثل تنوع ASBVd - B يكون عندها فرصة كافية للتعبير عن نفسها بالأعراض التى تحدثها.

إن دليل نجاح إنتقال الفيرويد بواسطة الطريقة السابقة يكون بواسطة التعريفات المنظورة للأعراض وبواسطة الكشف بطريقة sPAGE وهذه تحدث فى ٣ ـ ٨ شهور. فى جميع الحالات، بغض النظر عن مصدر اللقاح، فإن أعراض المجموع الخضرى الأولية هى إبيضاض الأوراق، بعد هذا الظهور يمكن أن يستدل بأن تنوع الفيرويد ASBVd - B موجود فى جميع تجمعات الفيرويد حتى عندما تكون مغطاة Masked عند الكشف بواسطة sPAGE بمستويات عالية من تنوعات ASBVd - V و ASBVd - Sc. كلما تقدم نمو الافوكادو المحقون بنسيج مبيض فإن أعراض الإبيضاض تظهر على فترات غير منتظمة.

أما النباتات التى حصل لها حقن من نسيج مبرقش أو نسيج حامل غير مظهر للأعراض، يتكشف أساساً أعراض تبرقش الورقة. إن التحليل بواسطة sPAGE أظهر على أن ASBVd - V يصبح التنوع السائد فى الأشجار المصابة، هذا يكون متوافق مع سيطرة وإنتشار أعراض التبرقش. مع استمرار الإصابة لأكثر من سنة فمن المحتمل إعادة اكتشاف فروع حاملة بدون أعراض تحتوى ASBVd - Sc من سيقان والتى لاتزال مظهرة أعراض التبرقش. من هذه الفروع فإن النباتات الحاملة بدون أعراض التى نتجت لم تظهر تعبيرات الأعراض المرضية أبداً حتى مع وجود معيار عالى من الفيرويد فى نسيج المجموع الخضرى.

يمكن رسم تتابعات الأعراض كالآتى:ـ

١ ـ إذا كان اللقـاح فيه تنوع B من ASBVd فإن تتابع الأعراض يكون كالآتى:ـ

B → Non - Symptomatic → B → Non - symptomatic → B → NS → B / → SC

٢ ـ إذا كان اللقاح فيه تنوع V أو تنوع Sc من ASBVd فإن تتابع الأعراض يكون كالآتى:ـ

(← V / ← Sc) → B → NS → V → NS → V → NS → V → B / → NS → NS → NS

ملاحظة إن NS تعنى Non - symptomatic.

مسبب المرض:

يتسبب مرض ضربة الشمس فى الافوكادو عن فيرويد ضربة الشمس فى الافوكادو Avocado Sunblotch Viroid (ASBVd) (وكان يكتب قبل سنة ١٩٩٢ بدون حرف d). يتكون الفيرويد من ٢٤٧ نيوكليتيدة ولكن بعض عزلاته أو تنوعاته تصل إلى ٢٥١ نيوكليتيدة.

إن هذا الفيرويد يمتلك موقع فريد بين الفيرويدات. من ناحية التركيب فإنه يمتلك تماثل تتابع محدود بالنسبة للفيرويدات الأخرى، ومن ناحية وظيفية فإن ASBVd هو الفيرويد الوحيد الذى ذكر عنه بأن نسخ ال RNA الخاصة به تتوالد فى المعمل (تنسخ) من كلونات cDNA وقابلة لأن تصنع فى أماكن خاصة فى غياب الأنزيمات. مع أن التتابع المتغير بين العزلات المختلفة من ASBVd قد إقترحت، إلا أن تتابع العزلات الاسترالية فقط من هذا الفيرويد هى المعروفة والمحددة جيداً. وقد تحدد تتابعات جميع العزلات الأسبانية من فيرويد ASBVd المتحصل عليها من أشجار الافوكادو نوع Fuerte المظهرة أعراض هذا المرض. وسواء فى

تتابعات العزلات الاسترالية أو العزلات الأسبانية فقد تبين أن جميع التتابعات المختلفة لوحظت فى العروتين الطرفيتين من الجزئ ولكن ليس فى جزئه المركزى والذى يبدو أنه مشمولاً فى التجهيز الذاتى لأنواع RNA السالبة والموجبة من الفيرويد ASBVd. إن ظهور تماثل تتابع عال يساوى أو أكثر من ٩٨٪ فى عزلتين مأخوذتين من أسبانيا وأستراليا (مناطق جغرافية مختلفة) يؤدى إلى القول أو التأكيد بأن الأصل مشترك لكلا العزلتين وأن منشأهما واحد.

فيرويد ضربة الشمس فى الافوكادو:

لقد وصف فيرويد ضربة الشمس فى الافوكادو ASBVd بأنه تركيب شبه عصوى من RNA يتكون من ٢٤٧ نيوكليتيدة والتى تحدث مجموعة أعراض مرض ضربة الشمس. إن هذا الفيرويد يعتبر غير نموذجى وذلك بسبب تتابع نيوكليتيداته وتركيبه. فإن التركيب الغنى بقاعدة A - U وتماثل التتابع المنخفض بالنسبة للفيرويدات الأخرى يجعل الفيرويد غير نموذجى. وبالتالى يمكن القول بأن ASBVd لا يتناسب مع الإجماع الذى إتفق عليه علماء الفيرويد لنموذج تركيب النطاقات الموصوف من قبل العالم Keese & Symons سنة ١٩٨٥. ومما يقلل حدة غضب العلماء على فيرويد ASBVd أن Harnandez and Flores قد ذكرا فى أبحاثهما الحديثة سنة ١٩٩٢ أن هناك فيرويد آخر له صفات لافتة للنظر وقريبة جداً من صفات فيرويد ASBVd وهذا الفيرويد الجديد إسمه فيرويد الموزايك الكامن فى الخوخ Peach latent mosaic Viroid (PLMVd) والمستقبل القريب سيكشف لنا الكثير عن هذا الفيرويد.

إن المعيار العال إلى حد بعيد من ASBVd والذى أحياناً يصل تركيزات 5 S RNA للعائل هذه أيضاً صفة غير عادية بين الفيرويدات. كذلك فإن المدى العائلى الضيق جداً والمحدود بشكل خاص فى العائلة الغارية Lauraceae وخاصة الجنس **Perea americana** أدى إلى القول بأن هناك علاقة خاصة جداً بين الفيرويد وعائلة النباتى.

فى الدراسات التى أجراها Marcos & Flores سنة ١٩٩٢ على تثبيط الفيرويد بمادة α - amanitin تبين أن بناء RNAs الخاصة بالفيرويد ASBVd لم يتأثر باستعمال ١ أو ٢٠٠ ميكوغرام / مللتر من هذه المادة مع أن تركيز ١ ميكوغرام / مللتر يثبط أنزيم RNA Polymerase II أما تركيز ٢٠٠ ميكوغرام / مللتر يثبط أنزيم RNA Polymerase III وهذه الأنزيمات تثبط بتلك التراكيز فى جميع النباتات والحيوانات. إن عدم تأثر تكاثر الفيرويد (نسخه وبناءه) بهذه التراكيز يدل على أن نسخه وبناءه لايعتمد على أى من هذين الأنزيمين، وبالتالى يمكن القول بأنه إما أنزيم RNA Polymerase I أو أنزيم RNA Polymerase غير محدد المعالم لهما نشاط مقاوم لمادة α - amanitin ولهما دور فى تناسخ الفيرويد إذن هذان الأنزيمان يؤثران على قالب RNA ويلعبان دوراً فى تناسخ الفيرويد ASBVd وهذه صفة جديدة لهذا الفيرويد حيث أن جميع الفيرويدات المدروسة حتى سنة ١٩٩٢ تستعمل RNA Polymerase II فى تناسخها أما هذا الفيرويد فلا يستخدمه.

إن وجود تنوعات للفيرويد ASBVd قد استدل عليها من الاختلافات فى تتابع النيوكليتيدات وتقديرات حجم الجزئ لعزلات الفيرويد. وعلى أية حال فإن هذه السلالات المقترحة أو المفترضة لم يثبت أبداً على أنها تنوعات مميزة بواسطة الاختلاف فى صفاتها البيولوجية.

ينتقل الفيرويد بالتطعيم وبالبذور وإن الطريقة الأساسية لإنتشار المرض هو استعمال أصول حاملة للمرض بدون إظهار أعراض مميزة.

كذلك فإن مقاومة المرض تكون باستعمال الأصول الخالية من وجود الفيرويد فيها وتأكيد ذلك بالعوامل التحليلية المختلفة وكذلك استعمال أقلام تطعيم خالية من الفيرويد بغض النظر عن وجود أعراض أم لا.

تمايز أعراض المجموع الخضرى فى الأفوكادو المصاب:

لقد وصف مرض ضربة الشمس فى الافوكادو عن طريق ظهور مجموعة أعراض شديدة الاختلاف، شاملة تخطيط الساق، تلون الثمرة وتبقعها بالإضافة إلى مجموعة أعراض على المجموع الخضرى مختلفة. بالملاحظة المستمرة للأشجار

المصابة تحت ظروف الصوبا الزجاجية لعدة سنوات أصبح من الممكن تعريف نموذجين محددين جيداً ومميزين من الأعراض على المجموع الخضرى. هذه الأعراض إما أن تظهر على شكل منطقة شديدة الإصفرار مترافقة مع الأنسجة الوعائية الناقلة (العروق الورقية) أو أن تظهر على شكل تبرقش (درجات مختلفة من تنوع اللون الأخضر) الذى ينتشر خلال الورقة شكل ٨٠. هذه النماذج يمكن أن توجد على الأفرع المختلفة من نفس الشجرة أو على شكل حالات منفصلة على أشجار مختلفة، وبالتالى فإن تفاعلات المجموع الخضرى المميزة مع الفيرويد يمكن تقسيمها إلى ثلاثة أنواع أساسية:ـ

١ ـ إبيضاض (إزالة اللون الأخضر) Bleached ويرمز لها الصفة B.

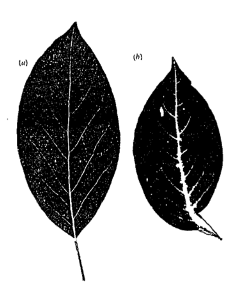
٢ ـ تبرقش (درجات مختلفة من اللون الأخضر) Variegated ويرمز لها V.

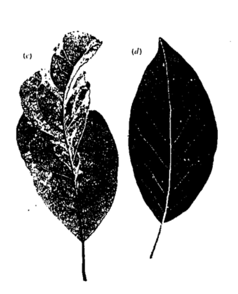
٣ ـ حاملة بدون أعراض (الفيرويد موجود ولكن لا تظهر الأعراض) Symptomless Carrier ويرمز لها Sc.

إن أكثر الأعراض الأساسية شيوعاً لمرض ضربة الشمس فى الافوكادو هو ظهور تخطيطات فى الساق، إلا أن أولى أعراض المجموع الخضرى والمنتشرة كثيراً هى ظهور مناطق صغيرة محددة جيداً خالية من اللون ولها المظهر المبيض. هذا العرض لا ينتشر إلا فى منطقة محددة جداً من الفرع وهى القمة النامية المفردة النشيطة ولا ينتشر أبداً فى بقية أجزاء الشجرة. إن مجموعة الأوراق التى تظهر هذا العرض، أحياناً يظهر عليها ابيضاض ملحوظ فى أعناق الأوراق وابيضاض فى العرق الوسطى مع وجود مناطق مشوهه فى قمة الورقة وقاعدتها ملاصقة للعرض الوسطى ذات نسيج مبيض.

فى بعض الحالات فإن النموات الجديدة من الفروع المحتوية أوراق مبيضة أيضاً يتكشف عليها نموذج الورقة المتبرقشة الذى يشبه التبرقش الوراثى. فى الأشجار المريضة الأخرى يظهر نسيج جديد سليم وغير مظهر للأعراض. من بين الأوراق المتبرقشة من الممكن أن نجد نصف ورقة يوجد عليها أعراض غير منفصلة بوضوح بواسطة العرق الوسطى عن النصف الثانى للورقة المصابة بالفيرويد وغير مظهرة

للأعراض. ولقد وجد أنه من غير الممكن التمييز بين الأوراق غير المظهرة للأعراض والتى تتكشف على فروع عليها أعراض والأوراق السليمة الخالية من الممرض.





شكل رقم ٨٠ :

مقارنة بين ورقة سليمة وثلاثة أوراق مصابـة من نبات الافوكادو المصاب بفيرويد ضربة الشمس a =ورقة سليمة، b = أعراض الابيضاض، c = أعراض التبرقش، d = الورقة حاملة للفيرويد ولكن بدون أعراض.

اكتشاف فيرويد ASBVd فى النسيج المصاب:

لاكتشاف الفيرويد ASBVd فى النسيج النباتى المصاب، تؤخذ نسج نباتية من مناطق مختلفة من الشجرة وتجرى عليها الإختبارات. ولقد تبين أن المعيار العال من تركيزات ASBVd يكتشف بواسطة طريقة sPAGE والتى فيها حرف (s) يرمز إلى sequential، وهذه الطريقة تكشف الفيرويد فى النوعين من الأعراض فى الأنسجة، الأعراض المبرقشة والأعراض المبيضة، وكذلك بهذه الطريقة يمكن اكتشاف الفيرويد فى مستخلصات نسيج غير مظهر للأعراض-Symptomless carri-er تابع للسلالة المبرقشة أما إذا كان تابع للسلالة المبيضة فإنه يكون بتركيز غير كاف لتعريفه تماماً.

كذلك تستعمل طريقة PCR amplification لزيادة حساسية الكشف من الأنسجة التى أعطت نتيجة سلبية للإختبار باستعمال sPAGE. بهذه العملية يمكن اكتشاف الفيرويد من مستخلصات أنسجة من مناطق غير مظهرة للأعراض أو أوراق مبيضة بالإضافة إلى نسيج غير مظهر للأعراض من نموات حديثة على فروع أظهرت مسبقاً أعراض ولكن كان إختبارها سالب لفيرويد ASBVd باستعمال sPAGE. يمكن القول بأنه يمكن اكتشاف الفيرويد ASBVd بطريقة sPAGE وطريقة PCR amplification فى جميع أنواع الأنسجة المحتوية فيرويد. إن الفيرويد ASBVd يمكن اكتشافه فقط بطريقة PCR فى الأوراق غير المظهرة للأعراض الموجودة فى النموات الحديثة من الفروع المحتوية أوراق مبيضة، أما الأوراق غير المظهرة للأعراض التى تكشفت من فروع فيها أوراق مبرقشة، عادة تحتوى معيار عال من الفيرويد يكون من السهولة اكتشافه بواسطة sPAGE. كذلك هناك علاقة مشابه بين الفيرويد فى الأوراق الحاملة وغير المظهرة للأعراض والأوراق المبرقشة يمكن اكتشافها فى الجزء غير المظهر للأعراض الذى من الورقة المبرقشة، حيث نستطيع اعتباره نوع من النسيج الحامل للفيرويد وبدون أعراض.

يمكن اكتشاف الفيرويد فى البراعم الزهرية فى الأشجار المصابة وذلك باستعمال PAGE. تستعمل البراعم الزهرية بدلاً من الأوراق كمصدر للفيرويد، وبمقارنة هذه الطريقة مع طريقة استعمال الأوراق نجد الأولى نسبة نجاحها ١٠٠ ٪، بينما نسبة نجاح طريقة استعمال الأوراق ٥٥ ٪. أما بالنسبة للوقت فتحتاج إلى ستة ساعات فقط.

تنوعات فيرويد ضربة الشمس فى الافوكادو:

Variants of Avocado Sunblutch Viroid

إن تحليل التتابع المقارن لتجمعات الفيرويد المتكونة طبيعياً قد شاركت بشكل معنوى فى زيادة معرفة هذا الفيرويد وعلى أساس هذه الدراسات قد إقترح نموذج للفيرويد مقسم إلى نطاقات من حيث التركيب والوظيفة وإقترحت مساهمة هذه النطاقات فى تطور الفيرويد. إن فيرويد ضربة الشمس فى الافوكادو فيه قليل من تماثل التتابع بالنسبة للفيرويدات الأخرى ويعتبر شاذ من هذه الناحية ويوضع فى التصنيف فى صف منفصل لوحدة من الفيرويدات. زيادة علي ذلك فإن فيه صفة أخرى لم تشترك معه فيها الفيرويدات الأخرى وهى مقدرة نسخ RNA للفيرويد بأن تتناسخ فى المعمل من كلونات Dimeric cDNA من الخيط الموجب والسالب للفيرويد، كذلك صفة الإنشطار الذاتى فى مواقع مخصصة فى غياب الأنزيمات.

باستعمال طريقة التحليل Fingerprint ثنائية الاتجاه مرتين للفيرويد ASBVd المنقى والمهضوم بأنزيم RNase البنكرياسى و T_1 أدى إلى القول بأن هناك تنوعات التتابع موجودة فى الفيرويد. زيادة على ذلك فإن هذه النتائج قد دعمت بالدنترة الحرارية لـ Profiles من هجين cDNA : ASBVd RNA متماثل وآخر المفترض أن يكون غير متماثل، ولقد تبين وجود عزلتين ذات ٢٤٧ نيوكليتيدة. ولقد ذكر

Pallas et al سنة ١٩٨٨ وجود عزلة مميزة واضحة بأقل تغيير فى القواعد فى العروات الطرفية اليمنى واليسرى من الجزئ عند مقارنتهـا مع التنوع الأصلى للفيرويد والمسمىSB - 1. ولقد ذكر Rakowski & Symons سنة ١٩٨٩ أن هناك ١٦ تنوع جديد من عزلات حصل عليها من ثلاثة أشجار أفوكادو من مناطق متفرقة.

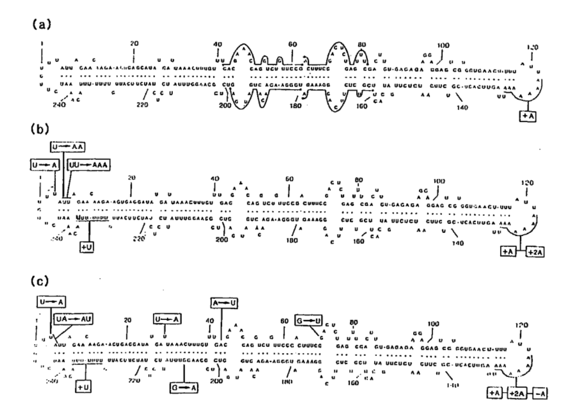
عند تنقية فيرويد ASBVd حسب طريقة Palukaitis & Symons من أوراق أشجار مظهرة أعراض مرضية مختلفة أو حاملة وغير مظهرة للأعراض وجد أن هناك ثلاثة عزلات A ، B، C. العزلة A فيها تتابع ٢٣ كلونة كاملة من cDNA ولها تنوعان. أما العزلة B فيها تتابع ١١ كلونة كاملة من cDNA ولها ستة تنوعات أما العزلة C ففيها تتابع ١٧ كلونة كاملة من cDNA ولها عشرة تنوعات. وقد استعملت التحضيرات النقية من الفيرويد لتوليد كلونات cDNA للفيرويد ASBVd من كل عزلة باستعمال إثنين من ال Primers المصنعة من Oligonucleotid. البرايمر الأول فيه ٢٢ قاعدة وهو 5`- d (TCGGAACAGACCTGGTTTCGTC) - 3` والتى تتهجن أطرافه مع مركز ٤٢ ـ ٦٣. أما البرايمر الثانى الذى يستعمل لتصنيع الخيط الثانى فيتكون من ١٩ قاعدة 19 - mer oligonucleotid وهـو 5`- d (CTTTCCGACTCTGAGTTTC) - 3` وهذا يتوافق مع الأطراف ٦٤ ـ ٨٢. ولقد استعمل زوج آخر من البرايمرز الأول لبناء الخيط الأول والثانى لبناء الخيط الثانى من الحمض البـادئ الأولـى. وهـذه البرايمـرز هـى 5`- d (TCTTTCCCTGAAGAGACGA) - 3` والثانى 5`- d ( TGGGAAGAACACTGATGAG) - 3`.

من بين ٥١ كلونة كاملة لـ cDNA محضرة من ثلاثة عزلات أمكن الحصول على ١٧ تنوع مختلف من ضمنها العزلة الأصلية SB - 1 جدول رقم ٥٦ إن تتابع العزلة الأصلية ASBVd - 1 - SB وجد فى ١٩ من ٢٣ كلونة لـ cDNA محضرة

من عزلة A والأربعة كلونات الباقية من cDNA كانت متماثلة مع بعضها ومختلفة عن تتابع SB - 1 عن طريق زيادة A مفردة فى المنطقة الممتدة من طرف A بين ١٢٢ ـ ١٢٨ والتى فيها سبعة A (شكل ٨١، a). جميع كلونات cDNA المحضرة من عزلة B و C تختلف عن تتابع SB - 1 بتغيير فى النيوكليتيدات، دخول نيوكليتيدات أو إزالة على تسعة مناطق ممكنة (شكل ٨١، b، c). إن قاعدة واحدة مفردة A→U تغيرت على الطرف ٢٩ كانت موجودة فى ثمانية من ٩ كلونات مختلفة من cDNA متولدة من عزلة C ولكن ليست فى التنوع من عزلة A و B. إن هذا التغير A→ U على أطراف ٣ ـ ٦ وجدت فى جميع كلونات cDNA المتولدة من عزلة B، علاوة على ذلك فى إثنتين فقط من عزلات C. فى كلونات cDNA لكل من عزلات B و C فإن نيوكليتيدة A المتعددة الموجودة بين طرفى ١٢٢ ـ ١٢٨ وكذلك U المتعددة والممتدة بين طرفى ٢٣٠ ـ ٢٣٦ تظهر تنوع فى الطول عن طريق إضافة وحذف فى الأطراف فى (شكل ٨١ ، b، c).

إن التنوع المتمثل بواسطة كلونـات cDNA من عزلات A ، B، C يختلـف فى الحجم من ٢٤٦ إلى ٢٥١ نيوكليتيدة. هناك إختلافات مماثلة لما فى هذا الفيرويد تحدث في فيرويدات أخرى مثل تنوعات فيرويد اكسوكورتز الحمضيات (يعنى تختلف التنوعات فى الأطوال) حيث تنوعاتـه مـن ٣٧٠ ـ ٣٧٥ نيوكليتيـدة، أما تنوعات فيرويـد الدرنـة المغزلية فـى البطاطس فهى ثابتة الحجم ٣٥٩ نيوكليتيدة.

إن التركيبات الثانوية المتوقعة للتتابعات المتولدة من عزلة B محتوية AA → U وكذلك UU→ AAA فى مراكز خمسة وستة (شكل ٨١، b). هذا سيؤدى إلى الحصول على عروة فـى اليد اليسرى أوسع من تلك الموجودة فى التنوع الأصل SB - 1. التركيبات الثانوية المتوقعة لجميع التنوعات تكون بشكل أساسى معتمدة على التنوع SB - 1 (شكل٨١، a).



شكل رقم ٨١ :

الاختلافات فى التنوعات من عزلات فيرويد ASBVd متمثلة فى a ،b ،c.

c : تدل على التركيب الثانوى المفترض للعزلة الأصلية SB - 1، النيوكليتيدات المتغيرة موضوعة فى مستطيلات والسهم يدل على حلول الثانية بدل الأولى.

a : تبين الأربعة مراكز البادئة فى مركز الجزئ والمستعملة فى توليد كلونات cDNA.

a، b، c : تبين النيوكليتيدات فى نهاية اليد اليمنى واليسرى من الجزئ وتبين مواقع الإضافة أو الحذف أو الإحلال وتبين زيادة الحجم فى U و A.

وعلى عكس ما هو مشابه فى مواقع التتابع المختلفة فى تنوعات فيرويد اكسوكورتز الحمضيات وفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس، فإن النهاية الطرفية لليد اليمنى واليسرى فى جزئ ASBVd هى مجموعة من النيوكليتيدات المختلفة. إن مناطق التتابع المختلفة فى تنوعات PSTVd و CEVd موجودة فى المناطق الممرضة

والمتغيرة وهى Pathogenic and Varialbe Regions. هذه المناطق تكون على أى طرف من المنطقة المركزية المحفوظة فى الفيرويدات الشبيهة بالفيرويد PSTVd ولكنها غير موجودة فى ASBVd.

إن عزلات B و C تتكون من مخلوط معقد من التنوعات بالمقارنة مع عزلة A التى فيها تنوعين فقط قد عرفا فى تتابع ال ٢٣ كلون من cDNA (شكل ٨١). من كلونات cDNA المتولدة من عزلات B و C هناك أكثر من النصف تمثل تنوعات مختلفة ومواقع متشابهة وجدت مع عزلتين فقط من عزلات CEVd والذى ذكر وصفه باسهاب فى حالة عزلة CEVd - J. هناك تسعة تنوعات وجدت فى تتابع ١١ كلون كامل من cDNA، بينما أربعة تنوعات وجدت فى تسعة كلونات كاملة من cDNA من عزلة CEVd - DE 30.

ومن المهم أن نذكر أنه من بين ال ٤١ موقع المتغير فى ١٦ تنوع بالنسبة لتتابع العزلة الأصلية SB - 1 فإن إثنتين فقط لم تدخلا فى الحذف أو الإحلال من U و / أو A. إن تنوعات C - 9 تحوى A → G أما تنوع C 10 فيحوى U → G (إحلال)، بينما مواقع C لم تتدخل فى أى تعديلات. إن إحلال A →U تحور سائد فى ٢٢ من ٤١ موقع تغيير.

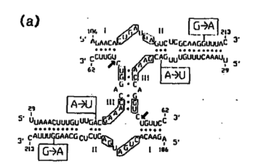
إن تنوعات عزلة C تحتوى نيوكليتيدات متغيرة فى المنطقة المحددة بالبوادئ المستعملة لتحضير أول مجموعة من كلونات cDNA. هذه النتيجة تؤكد ضرورة تتابع المناطق دائماً تحت البرايمرز فى حالة حدوث عدم موافقة. هذه الاختلافات تحدث ضمن تتابع التركيبات الثانوية لرأس المطرقة الموجب والسالب المزدوج والذى هو ضرورى للانشطار الذاتى فى جزئ ASBVd فى المعمل شكل ٨٢، ولكن لاتتضمن تلك القواعد المحفوظة بشكل كامل بين إنشطار ذاتى آخر لـ RNAs محتوية تركيب رأس المطرقة.

بالنسبة لتنوع C - 10 فإن تغير النيوكليتيدات U → G على موقع ٧٠ يكون على مكان الانشطار الذاتى للخيط السالب RNA (شكل ٨٢، b). وعلى أية حال فإن نشاط عملية الإنشطار الذاتى خلال النسخ ل RNA سالب للتنوع C - 10 كان

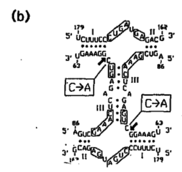
مشابهاً ٥٥٪ تقريباً للنسخ للخيط السالب RNA فى SB - 1 باستعمال كلونات Dimeric cDNA.

ومن المسلم به أن أى من هذه التنوعات يمكن أن يكون نتيجة لحدوث نسخ خطأ أثناء بناء cDNA، لأننا لو أردنا أن نتأكد عملياً من ال ٥١ كلونة المنسوخة من cDNA باختبار كل واحدة على حدة لاحتاج الأمر إلى سنتين أو أكثر. وبالنسبة لتنوع C - 16 و C - 17 فإن الإنشطار الذاتى فى المعمل هو نتيجة للعمل ولكن يمنعها من تمثيل تنوع التتابع الذى يحدث طبيعياً نظراً لأن الإنشطار الذاتى يعتبر بأنه يلعب دوراً هاماً فى تناسخ ASBVd. واعتماداً على أبحاث Semancik سنة ١٩٩٤ فإن تنوع ASBVd - Sc يشابه ASBVd - SB1.

(a)



(b)



شكل رقم ٨٢:

نموذج تركيب ثانوى لرأس المطرقة المضاعف لمواقع الانشطار الذاتى الموجبة والسالبة فى ASBVd - SB - 1 وتغير القاعدة المفردة الموجود فى تنوعات C - 9 الموجب (a) و C - 10 السالب (b). إضافة روابط هيدروجينية محيطية جانبية تربط الساق فى مراكز ٢٩ – ٤٠. التحول من G → A يتغير فى موقع ٢٠٨ مشمولاً فى شكل (a). النيوكليتيدات الموضوعة فى مستطيلات هى المحفوظة بين جميع RNAs ذاتى الانشطار المشابهة. أما أرقام I، II و III والأسهم فإنها تدل على الروابط الهيدروجينية التى تربط السيقان ومواقع الانشطار وهذا أيضاً محفوظ بين التركيبات لشبه رأس المطرقة فى التتابع السالب، فى نفس رقم ومركز النيوكليتيدة تكون محتجزة كما فى التتابع الموجب.

جدول ٥٦ : توضيح مختصر لتغير النيوكليتيدات فى التنوعات المتحصل عليها من عزلات فيرويدات ضربة الشمس فى الافوكادو C ، B ، A بالمقارنة مع العزلة الأصلية SB - 1.

عزلة الفيرويد	تنوع التتابع	عدد كلونات cDNA التى لها نفس التتابع	أرقام النيوكليتيدات التى فى العزلة الأصلية SB - 1 والتى يحدث لها تغير		عدد النيوكليتيدات فى تنوع التتابع
A	A - 1	١٩	—	—	٢٤٧
	A - 2	٤	١٢٢ ـ ١٢٨	+A	٢٤٨
B	B - 1	١	٣	U→ A	٢٤٩
			٥	U→ AA	
			٢٣٠ ـ ٢٣٦	+U	
	B - 2	١	٣	U → A	٢٥١
			٥	U → AAA	
			١٢٢ ـ ١٢٨	+A	
			٢٣٠ ـ ٢٣٦	+U	
	B - 3	١	٣	U → A	٢٥١
			٥	U → AA	
			١٢٢ ـ ١٢٨	+2A	
			٢٣٠ ـ ٢٣٦	+U	
	B - 4	٥	٣	U → A	٢٤٨
			٥ ـ ٦	UU → AAA	
	B - 5	٢	٣	U → A	٢٤٩
			٥ ـ ٦	UU → AAA	
			٢٣٠ ـ ٢٣٦	+U	
	B - 6	١	٣	U → A	٢٤٩
			٥ ـ ٦	UU → AAA	
			١٢٢ ـ ١٢٨	+A	
C	C - 1	١	١٢٢ ـ ١٢٨	+A	٢٤٨
	C - 2	٤	٢٩	U → A	٢٤٧
	C - 3	٢	٢٩	U → A	٢٤٨
			١٢٢ ـ ١٢٨	+A	
	C - 4	١	٢٩	U → A	٢٤٦
			١٢٢ ـ ١٢٨	-A	
	C - 5	٢	٢٩	U → A	٢٤٩
			١٢٢ ـ ١٢٨	+2A	
	C - 6	٣	٢٩	U → A	٢٤٨
			٢٣٠ ـ ٢٣٦	+U	
	C - 7	١	٢٩	U → A	٢٤٩
			١٢٢ ـ ١٢٨	+A	
			٢٣٠ ـ ٢٣٦	+U	
	C - 8	١	٣	U → A	٢٤٧
			٢٩	U → A	
	C - 9	١	٤٣	A→ U	٢٤٨
			١٢٢ ـ ١٢٨	+A	
			٢٠٨	G → A	
	C - 10	١	٣ ـ ٤	UA→ AU	٢٤٧
			٢٩	U → A	
			٧٠	G → U	

اكتشاف فيرويد ضربة الشمس فى الافوكادو فى البلاستيدات الخضراء فى الأوراق: هل بكتيريا البناء الضوئى همزة وصل بين الفيرويدات والنباتات؟؟

لقد صنف فيريد ضربة الشمس فى الافوكادو فى تحت مجموعة خاصة من الفيرويدات وذلك لصفاته المميزة الفريدة عند مقارنته مع الفيرويدات معروفة التتابع. إن التتابع الموجود فى فيرويد ASBVd يظهر تماثل منخفض بالنسبة للفيرويدات المعروفة الأخرى، بالإضافة إلى أن الخيوط الموجبة والسالبة من RNA الفيرويدى عندها القابلية لأن تخضع لتفاعلات الانشطار الذاتى فى المعمل خلال تركيب رأس المطرقة. إن عملية التحلل الذاتى والتى من المحتمل أيضاً أن تكون فعالة أو مؤثرة فى ميكانزم التضاعف فى الطبيعة لهذا الفيرويد، فإنه يتشارك فيها أو يشترك معه فقط فيرويد الموزايك الكامن فى الخوخ Peach Latent Mosaic (PLMVd) Viroid وغير موجودة فى أى من الفيرويدات النموذجية الأخرى مثل PSTVd وغيره. إن تجارب تفريق الجزيئات تحت الخلوية (أصغر من الخلية) قد أظهرت موقع PSTVd فى الأنوية وخاصة فى أجزاء النوية فى أوراق الطماطم المصابة، هذه الملاحظة تأكدت بواسطة طريقة التهجين فى الموضع Situ - hybridization والتحليل بواسطة Confocal laser scanning microscopy of the fluorescent Signals للمواد المنتجة بواسطة PSTVd فى الأنوية المعزولة. كذلك فإن فيرويدات أخرى تشترك بتماثل تتابع عال مع PSTVd تظهر أيضاً فى ترافق مع الأنوية، وفى بعض الحالات مع مكونات الغشاء، وعلى أية حال عندما درس إنتشار الفيرويد ASBVd فى الأجزاء تحت الخلوية (أقل من خلية) فوجد الفيرويد بشكل أساسى مترافقاً مع البلاستيدات الخضراء و / أو الشبكة الاندوبلازمية أو مع السيتوبلازم هذا يدل على أن ASBVd يبدو أيضاً أنه فريد فى هذه الناحية وهذه إضافة جديدة لصفاته الفريدة.

إن تتابعات RNA فى تحضيرات النسج يمكن أن تتمركز فى وضع معين عن طريق إتحادات فى التهجين فى الموضع والميكروسكوب الالكترونى ونظراً لأن هذه الطريقة أقل عرضة أو ميلاً للتكاثر الصناعى منها فى إجراءات التفريق فلقد

استعملت لغاية ١٩٩٤ فى حالة الفيرويدات. ولقد كانت هناك دراسة لاستكشاف كفاءتها عن طريق إعادة الإختبار لمعرفة تمركز ASBVd فى الأجزاء تحت الخلوية.

طريقة الكشف عن مكان تواجد الفيرويد:

أخذت أجزاء ورقة من نبات افوكادو **Persea americana** سليمة وأخرى مصابة ولكنها غير مظهرة للأعراض بفيرويد ASBVd العزلة الأسبانية وثبتت فى مثبت Karnovsky المحور والذى يتكون من- 2% glutaraldehyde, 2% Paraformal-dehyde in 50 mM cacodylate buffer pH 7.2, with 5mM $CaCl_2$ لمدة ساعتين وأجرى لها عملية dehydrated خلال سلسلة ايثانول على درجة (ـ ٢٠°م) وغمرت فى LRGold على درجة حرارة (ـ ٢٠°م) تحت الأشعة فوق البنفسجية. حملت مقاطع ذهبية اللون على شبكات نكل ١٥٠ ميش (mech) مغطاة بغطاء Formvar. أجرى التهجين كما فى طريقة McFadden G.1 سنة ١٩٩٠ باستعمال منقب RNA معلم بمادة داى جوز جنين وموجه ضد الخيط الموجب من RNA (وهو الفيرويد المعدى والمسيطر من RNA الفيرويدى) تحت ظروف شديدة (٦٠°م، ٥٠٪ فورماميد Formamde) لمدة ٣ ساعات. صنع المنقب عن طريق النسخ فى المعمل لـ linearized plasmid محتوياً على وحدة كاملة الطول مغروزة فى ASBVd باستعمال T_7 RNA Polymerase و- Digoxigenin - 11 - UTP. تفحص الشبكات فى الميكروسكوب الالكترونى JEOL JEM 100C. كانت تجرى عملية تقدير المناطق المشغولة بواسطة عضيات الخلية على طابعات بتكبير ٥٠٠٠ باستعمال Area Meter موديل LI - 3100 (LI - COR) وهذا النموذج معروف فى أمريكا.

فى التهجين فى الموضع كان التقدير يتم عن طريق عد الأجزاء الذهبية الغروية التى كانت ملاحظة باستمرار فى البلاستيدات الخضراء، بعد عد هذه الأجزاء الصغيرة تبين أن معظم البلاستيدات الخضراء فى النسيج المصاب بالفيرويد ASBVd تحتوى بمعدل ١٢ حبيبة والتى تمثل ٧٠ ـ ٨٠٪ من عدد الحبيبات الكلى جدول ٥٧.

بقية الحبيبات تظهر فى السيتوبلازم والفجوة. أما بقية مكونات الخلية الأخرى مثل الميتوكندريا، الأنوية وجدر الخلية كانت لا تحتوى شئ يذكر. نفس الشئ لوحظ فى العدد المطلق للحبيبات فى العضية الواحدة، ذكرت أيضاً عندما كانت كثافة الحبيبة لكل وحدة مساحة فى كل عضية محسوبة. عندما قورنت هذه القياسات بين نباتات الكنترول والنباتات المصابة كان هناك زيادة معنوية أكثر من عشرة أضعاف يمكن أن تكتشف فى البلاستيدات الخضراء المعلمة والسيتوبلازم من الخلايا المصابة بالفيرويد ASBVd. فى تجارب إضافية أخرى على الكنترول نفسه باستعمال نسيج مصاب بالفيرويد ASBVd ومنقب موجه ضد الخيط الموجب لفيرويد اكسوكورتز الحمضيات (هذا الفيرويد يختلف كثيراً فى تتابعه عن فيرويد ASBVd) فإن معدل حبيبة واحدة لكل عضية قد لوحظت فى العد (باستثناء الميتوكندريا) وهكذا كانت القيمة أقل بعشرة أضعاف فى CEVd.

إن اكتشاف الفيرويد ASBVd فى البلاستيدات الخضراء chloroplasts عن طريق التهجين فى الموضع أكد جزئياً مناقشات سابقة عن تمركز ASBVd فى البلاستيدات الخضراء أو الشبكة الاندوبلازمية مبنياً على معلومات محددة حصل عليها عن طريق التفريق بآلة الطرد عن المركز وهذا ما ذكره Mohamed & Thomas سنة ١٩٨٠، ومن ناحية ثانية فإن دراسات متقنة عن أجزاء الخلية التى تهاجم بالفيرويد ASBVd ذكرت أن الفيرويد موجود فى السيتوبلازم وكميات أخرى توجد فى البلاستيدات الخضراء وهذا ما ذكره Marcos J.F. سنة ١٩٩٠.

نستطيع أن نقرر الآن بأن قليل جداً من الفيرويد ASBVd يمكن أن يوجد فى السيتوبلازم، إلا أن معظم الفيرويد يكون مترافقاً مع البلاستيدات الخضراء. إن تمركز الفيرويد ASBVd فى البلاستيدات الخضراء آثار استفسارات هامة وكثيرة وننتظر من الأبحاث المستقبلية الإجابة عليها.

إن مركز تجمع الفيرويد ASBVd يختلف عن المركز تجمع فيرويد PSTVd وبعض الفيرويدات المماثلة هذا يدل على تفاعلات متميزة بين خلية العائل

والفيرويد فى هذين المقعين. ومن المهم أن نعرف أنه إذا كان فيرويد PLMVd وهو الفيرويد الوحيد الآخر المعروف والذى يشارك فيرويد ASBVd فى عملية التحليل الذاتى لسلاسل RNA، هل هو أيضاً يتمركز فى البلاستيدات الخضراء؟؟ فإذا كانت الإجابة نعم فيكون هناك مجموعة جديدة من الفيرويدات لها صفات معينة ولها مجال جديد فى التمركز، إلا أنه لسوء الحظ فإن هذا الفيرويد الجديد يتواجد بمستويات منخفضة جداً تجعل هذه الدراسة صعبة، إلا أن العلم ليس عليه حاجة صعبة فالمستقبل القريب سيجد حلاً لهذه المشكلة ونعرف الكثير عن الشقيق الجديد PLMVd.

ومن ناحية أخرى (سبق أن ذكرنا ذلك) فإن تناسخ الفيرويد ASBVd قد تبين بأنه غير حساس للمستويات العالية من α - amanitin هذا يؤدى إلى القول بأنه إما أن أنزيم النواة والذى يسمى RNA - Polymerase like 1 أو لنشاط أنزيم RNA - Polymerase غير معروف أيضاً مقاوم لمادة α - amanitin تعمل على قالب RNA وتلعب دوراً فى تناسخ ASBVd. وبالتالى يمكن القول بأن تناسخ ASBVd يمكن أن يساعد Catalyzed by بواسطة الأنزيم المسمى RNA Polymerase like 1 فى الأنوية مع الفيرويد ثم ينتقل إلى البلاستيدات الخضراء، أو يكون هناك بديلاً يمكن أن يتناسخ فيه وهو البلاستيدات الخضراء نظراً لأن نشاط أنزيم RNA - Polymerase لهذه العضية يكون غير حساسا لمادة α - amanitin.

أخيراً فإنه من المؤكد أن ASBVd وبعض الفيرويدات الأخرى تتكاثر أيضاً فى البلاستيدات الخضراء، هذا يؤدى إلى القول باحتمالية أن بكتيريا البناء الضوئى يمكن أن تكون واحدة من الحلقات بين الأجداد العليا للفيرويد والنباتات وإشارات على احتمالية وجود RNAs شبيهة بالفيرويدات فى بدائيات النـواة والنباتات الأولية.

هذه الفقرة الأخيرة تكون جواباً للسؤال الذى كان موضوع عنواناً لهذا البحث.

جدول ٥٧: تقدير الشكل القياسى للمناطق المشغولة بواسطة العضيات الخلية المختلفة ونتائج التعليم المنيع للذهب immunogold بعد التهجين فى الموضع باستعمال منقب cDNAموجه ضد الخيط الموجب منASBVd فى أنسجة ورقة أفوكادو مصابة بالفيرويد وأخرى سليمة.

الجزء المختبر فى الورقة	العضيات المعدودة فى		متوسط مساحة المنطقة Um^2				أجزاء الذهب المعدودة			
							لكل عضية		لكل Um^2	
	أوراق سليمة	أوراق مصابة	سليمة	٪	سليمة	٪	سليمة	مصابة	سليمة	مصابة
بلاستيدات خضراء	٢٩	٧١	١٤٢,٨	٧,٦	٢٥٤	١٧,٧	٤٠	٨٣٣	٠,٢٨	٣,٢٨
سيتوبلازم	١٠	٢٧	٨٦٤,٩	٤٦	٣٦٥,٧	٢٥,٤	٩	٧١	٠,٠١	٠,٢
ميتوكندريا	٣٠	٨١	٨,٦	٠,٥	٩,٨	٠,٧	٣	٤	٠,٢٨	٠,٣٥
فجوة	١٠	٢٠	٨١٨,٥	٤٣,٦	٧٣٧,٣	٥٠,٦	٢١	٢٥	٠,٠٢٦	٠,٠٣٤
نواة	٦	٢٣	٤٣,٤	٢,٣	٨١,٢	٥,٦	٧	٩	٠,١٥٢	٠,١٠١

ملاحظة:

حللت ١٠ خلايا سليمة من خلايا ميزوفيل الأفوكادو و ٢٧ خلية ميزوفيل مصابة بالفيرويد.

ملخص أبحاث العالم Semancik عن فيرويد ضربة الشمس فى الأفوكادو:

إن الميكانيكية التى بواسطتها ينعزل الفيرويد أو يتوزع بدون إنتظام ضمن أنسجة العائل من الأشجار الخشبية هى غير مفهومة جيداً، فمثلاً مخلوطات فيرويدات الحمضيات والذى يبقى فيها الفيرويد ثابتاً لعدة سنوات فى البرتقال الحلو-**Citrus sinensis** أو السترون **C. medica** غالباً ما تنعزل إلى عدة نماذج فى الكريب فروت **C. paradisi** والمندرين **C. reticulata**. إن نقص الفيرويدات المتخصصة من المخلوط يحدث عادة مع مخلوط من فيرويدات غير متقاربة. إن معيار الفيرويد وشدة الأعراض لا يبدو أنها عوامل كمفاتيح فى نقص المكونات من المخلوط.

إن التوزيع المتناقض الذى يظهر أثناء الكشف عن الفيرويد ASBVd يؤدى إلى فحص جميع أجزاء النبات وتحديد أماكن توزيع هذا الفيرويد. هذا الفيرويد الذى يستطيع أن يتجمع إلى معيار عال جداً وجاهز للكشف، فى كثير من الحالات من المستحيل كشفه فى الأنسجة غير المظهرة للأعراض من الأشجار التى سبق إختبارها بنتيجة إيجابية لمرض ضربة الشمس. هذا يؤدى إلى القول بالتوزيع غير المنتظم للفيرويد فى أنسجة العائل أو التجمع المتمركز لتنوعات مميزة للفيرويد. إن الخفض أو المنع أو إبعاد الفيرويد من الأجزاء غير المظهرة للأعراض فى الورقة التى هى مظهرة أعراض قد ذكر فى كثير من الأبحاث.

إن إختلافات حجم الجزئ بين التنوعات قد أستدل عليه بواسطة استعمال التحليل بـ PAGE تحت ظروف غير مدنترة وارتبطت مع وجود أو غياب الأعراض، هذه الفرضية سنة ١٩٨٤ لا تؤيد بالأبحاث الحديثة سنة ١٩٩٤.. إن إختلاف حجم الجزئ فى التنوعات يمكن اكتشافه فى الأجزاء المظهرة أعراض والتى تبين أعراض إما إبيضاض أو تبرقش. لا يوجد حجم غير متماثل قد اكتشف بواسطة sPAGE بين تنوعات ASBVd من مستخلص أنسجة حاملة بدون أعراض (Sc) أو ذات أعراض تبرقش (V).

عندما تعرف إنعزالات فيرويد عن طريق ظهور أعراض معينة يحدث زيادة كبيرة فى اكتشاف تتابع تنوع معين. من هذا أصبح من الممكن إختيار أنسجة بالمنظر والتى تحتوى تنوعات تتابـع مميزة من تجمعات بتنوعات مثل ASBVd - B و ASBVd - V و ASBVd - Sc.

ولدعم الدليل على حدوث إنعزالات لتجمعات فيرويد محددة ضمن أنسجة يمكن أخذها من الحركة المحددة بشكل كبير لـ ASBVd - B من المناطق المظهرة للأعراض إلى المناطق غير المظهرة للأعراض فى أوراق مفردة مظهرة أعراض الإبيضاض. نظراً لأن الإبيضاض هو عرض المجموع الخضرى الأولى لمرض ضربة الشمس،فإن الدور الأولى فى الإنتقال نستطيع أن نستنتجه بأنـه سيظهـر

بـASBVd - B وبالتالى فإن الحيوية النوعية Specific infectivity المنخفضة لتحضيرات من مسبب مرض ضربة الشمس فى الأفوكادو يمكن أن توضح بواسطة المعيار المنخفض من ASBVd - B. إن تنوع ASBVd - B يمكن أن يكتشف حتى فى الزيادة الضخمة من ASBVd - V و ASBVd - Sc وهذا يتميز بظهور الإصابة متأخرة.

إن تجمعات التنوعين السائدين من ASBVd وهما تنوع V و Sc غير مقيدة فى أنسجة العائل. وعلى أية حال فإن هذه الأشكال من ASBVd ليست شائعة خلال الأطوار الأولى من الإصابة بضربة الشمس، إنها تظهر كأشكال ثانوية والتى تميل إلى التجمع باستمرار الإصابة.

إن المواقع السائدة فى التتابع غير المتماثل فى ASBVd هى العروات الطرفية، وإن إختلافات النيوكليتيدات التى توجد فى ثلاثة تنوعات تعكس هذا. وعلى أية حال فإن هذا غير مشابه لأكثر التتابعات حفظاً فى نطاقى T_1 و T_2 من الفيرويدات الأخرى.

إن النتيجة الإيجابية التى حصل عليها Rakowski & Symons سنة ١٩٨٩ فى أبحاثهما على مرض ضربة الشمس فى الافوكادو، وقياسها على أبحاثنا نجد أن تتابع A - 1 الذى ذكره الباحثان ممثل فى أبحاثنا فى SB - 1 وهو التنوع الأصلى للفيرويد. وكذلك فنحن قد وجدنا أن ASBVd - Sc فى تتابع نيوكليتيدات كلوناته مشابهة لما هو فى ASBVd - SB1. عندئذ يمكن القول أن تتابع A - 1 يماثل تتابع Sc ويماثل تتابع الفيرويد الأصلى ASBVd - SB1. إن المعيار العال من عـزلة فيرويد ضربة الشمس ASBVd - Sc واسع الإنتشار خلال أنسجة الأفوكادو (وهذا يؤكد الاستنتاج الذى ذكرناه سابقاً) من المحتمل أن يكون مساوياً للعزلة الأصلية SB - 1.

أما التنوع A - 2 فهو أكبر من A - 1 بنيوكليتيدة واحدة ويوجد فى أربعة كلونات cDNA وهو متطابق مع ASBVd - V تتابع كلون ١٤ فى أبحاثنا. جميع

التنوعات الكبيرة بين ٢٤٩ و ٢٥١ نيوكليتيدة المذكورة من قبل العالمين السابقين تتمثل بواحد أو إثنين من كلونات cDNA، هذه الكلونات كانت موجودة بتكرار منخفض وهى مشابهة لـ ASBVd - B.

إن التغيرات والإضافات فى اليد اليمنى من عروة ASBVd - V يجعلنا نتنبأ بأنها ستؤدى إلى جعل المنطقة الطرفية أوسع أو مفتوحة أكثر. إن التوسع المقترح فى تكرار A فى العروة اليمنى من ASBVd - B ادخلت تحور استثنائى فى التركيب مع ضمانات للدور الأولى المقترح لهذا التنوع فى بدايـات مرض ضربة الشمس. لقد إقترح Godman et al سنة ١٩٨٤ أن تناسـخ الفيرويد يمكـن أن يبدأ عن طريق ربط أنزيم RNA - polymerase II المعتمد على DNA فى العروة الطرفية مـن جزئ الفيرويد وأن هذا التغييـر التركيبى يمكن أن يعمـل كموقع ربط متخصص.

إن تقدم الأعراض وإنتاج الفيرويد من البدايات لتكشف إصابة ضربة الشمس تظهر مميزات كل من الإصابات الحادة والدائمة. إن الطور الأولى لمرض ضربة الشمس يتميز عن طريق الكشف لتنوع ASBVd - B فى تفاعل ذاتى محدد وهذا يكون مشير لشكل إصابة حادة. التعبيرات المرضية تبدأ عن طريق ASBVd - B ثم تتكشف بعد ذلك إلى إصابة دائمة كامنة مع إصابة دورية ولكن يحدث تغييرات غير متكررة تقطعها إما أعراض الإبيضاض أو التبرقش.

وأخيراً فإن مرض ضربة الشمس يكون أفضل وصف له بأنه إصابة مزمنة مع إنتاج معيار عال ومستمر ويمكن تقديره من ASBVd - Sc خلال العائل. إن هذه العلاقة الأخيرة الوطيدة بين العائل والكائن الممرض من الصعب جداً إدراكها بوضوح نظراً لأنها غير متبوعة بأية أعراض. هذا الطور يتميز بخفض كبير فى إنتاج الثمار وزيادة كبيرة منسجمة فى النقل بالبذرة فى بعض الزراعات.

إن المعيار العال من ASBVd - Sc المكتشف فى الأنسجة غير المظهرة للأعراض يدل على تحول فى مسبب مرض ضربة الشمس إلى الشكل الذى يكون فيه مثل non - antagonistic RNA والذى يتواجه مع الأحماض النووية المنظمة فى العائل. برغم ذلك ونظراً لأن المستلخصات من هذه الأنسجة عندها المقدرة على إحداث الشكل الحاد أو المبيض من الإصابة إلا أن ASBVd - B يجب أن تتواجد ولو على أقل مستوى مطلوب وضرورى لإحداث إصابة حتى فى وجود معيار عال جداً من ASBVd - Sc. وبالعكس فإن بعض الأبحاث تفترض وجودASBVd - Sc فى تجمع حتى يحدث فيه توسيع العروة الطرفية اليمنى فى الجزئ لكى تحدث إعادة تنشيط للعزلة ASBVd - B ويزداد عددها وتحدث إصابة وهكذا.

بهذا التقرير الذى قدمه العالم Semancik سنة ١٩٩٤ يظهر واضحاً الاسهاب فى شرح فيرويد ضربة الشمس فى الافوكـادو، وذكر كل شئ معروف عنه تقريباً.

٢ ـ فيرويدات الخوخ
Peach Viroids

أ ـ مرض الموزايك الكامن فى الخوخ

مقدمة:

ذكر هذا المرض فى الولايات المتحدة الأمريكية فى أوائل الخمسينات وكان يسمى موزايك الخوخ Peach mosaic وكان يعزى إلى مسبب فيروسى، إلا أن طرق إنتقال الكائن المسبب لم تكن واضحة واستمرت الأبحاث عليه حتى إتضح جيداً أن المرض لا يتسبب عن فيرس.

كان أول ذكر لهذا المرض فى فرنسا سنة ١٩٧٦ بواسطة العالم Desvignes وذكر أن هذا المرض منتشر بشكل كبير جداً فى فرنسا ويهاجم معظم أصناف الخوخ المزروعة. ذكر أيضاً فى اليابان فى نهاية السبعينات وكان يسمى قبل ذلك باسم الموزايك الأصفر فى الخوخ Peach Yellow mosaic.

ينتشر هذا المرض فى فرنسا بشكل كبير جداً، فقد وجد أن ٢٠ ٪ من زراعات الخوخ القادمة من أمريكا مصابة بهذا المرض وأن ٤٠ ٪ من الزراعات القادمة من اليابان مصابة بالمرض نفسه. أما فى الأصناف الأمريكية فينتشر المرض بنسبة ٨٨ ٪ وتصل النسبة فى الأصناف الأسبانية ٩٤ ٪. يبدو أن هذا المرض عالمى الإنتشار. لقد ذكر أن حوالى ٤٠٠ صنف من الخوخ فى مركز الأبحاث فى فرنسا أنها حاملة للمرض. لقد وجد أن هذا المرض متخصص على الخوخ ولم يمكن نقله أو اكتشافه فى النباتات الخشبية أو الشعبية.

استطاع العالم Desvignes et al ورفقاءه أن يثبتوا بأن هذا المرض يتسبب عن فيرويد وليس عن فيرس.

الأعراض:

إن مرض الموزايك الكامن فى الخوخ هو بشكل عام كامن فى أشجار الخوخ **Prunus persica** . تظهر أعراضه على شكل موزايك على قليل من الأوراق فقط. أولى علامات المرض تصبح واضحة على أشجار الخوخ ذات عمر سنتين، يصعب اكتشاف الأعراض قبل هذا العمر. تشمل هذه الأعراض تأخير فى التوريق (إظهار الأوراق) والأزهار والنضج. مدة التأخير هذه تختلف من أسبوع إلى أسبوعين ولكن فى معظم الحالات لا يقل التأخير عن أسبوع. ثانى علامات المرض هو ظهور خطوط متقطعة أرجوانية على بتلات الأزهار ذات اللون الأبيض الوردى وتكون هذه العلامة واضحة فى الجو الدافئ. أما الثمار زيادة عن كونها تتأخر فى النضج يصبح سطحها خشن وذات شكل غير منتظم مسطحة قليلاً ذات لون غير طبيعى يميل إلى الأبيض مع وجود شقوق على خط التحام نصفى الثمرة. يظهر بقع على سطح الثمرة تختلف عن لون جلد الثمرة. تكون الثمرة سهلة الفتح أو تكون مفتوحة قليلاً إلا أن هذا العرض الأخير نادر الحدوث.

تبدو الأشجار وكأنها متقدمة فى السن أكثر من سنها الطبيعى بعدة مرات بعد أن تتخطى خمسة سنوات. يظهر نكروزز فى البراعم وتكون الشجرة أكثر حساسية لأضرار الصقيع وأمراض التقرح. يحدث المرض خسائر إقتصادية كبيرة جداً فى بعض الحالات وتكون الأشجار بحالة يرثى لها (شكل ٨٣).

تسبب بعض عزلات الفيرويد موزايك على شكل لطع كبيرة وظهور تنقيط ونكروزز فى الأوراق، هناك عزلات أخرى تسبب تنقر الساق والتفاف الأوراق. تتقزم السيقان وتكون غليظة ومنتفخة، تتجمع الأوراق فى قمم الفروع على شكل خصلات وتبدو الشجرة ذات نموات حديثة قصيرة وقليلة جداً وتكون كمية

الإثمار منخفضة جداً. الأوراق تكون رفيعة وضيقة بها بقع صفراء وخضراء (شكل ٨٤).

إن هذا المرض اسمه Peach latent mosaic Disease مرض الموزايك الكامن فى الخوخ. من هنا ينشأ إستفهام، إذا كان هذا المرض كامن فلماذا تظهر كل هذه الأعراض؟؟. للإجابة على هذا السؤال نقول إن كلمة الكامن (Latent) فى الاسم ادخلت وصفاً للمرض منذ أول ملاحظة له فى فرنسا، حيث لم تلاحظ الأعراض على الأوراق فى البداية. وكذلك يقصد بها أن معظم الأعراض سواء الناتجة طبيعياً أو بالعدوى الصناعية لا تظهر على الأوراق فى البداية وذلك لأن أهم علامات المرض التى ذكرناها سابقاً هى تأخير التوريق والإزهار والنضج وتشوه الثمرة وتشقق الخط الواصل بين نصفى الثمرة وهكذا كما ذكرنا سابقاً وأن الأعراض لاتكون واضحة على الأوراق قبل ٢ - ٣ سنوات، وبالتالى استعملت كلمة الكامنLatent والمقصود بها على الأوراق. ثم بعد أن عرفت جميع أعراض المرض فى مراحل نمو النبات المختلفة ومنها الأوراق لم تحذف الكلمة واستمر استعمالها ولكن بدون مدلول منطقى.

هناك دراسات أجريت فى إيطاليا استمرت لعدة سنوات على ثمار خوخ مصابة بمرض معين فى مناطق البساتين المختلفة وخاصة فى مقاطعة Ravenna. أعراض هذا المرض تكون على شكل دوائر صغيرة واضحة على جلد الثمرة ذات لون أصفر مخضر خفيف. هذه الأعراض تخفض من القيمة التسويقية للثمار. المرض هذا ينتشر فى كثير من المناطق المحددة ومعروف فيها.

إن التحليل بطريقة PAGE لمستخلصات الأحماض النووية للثمار والأوراق أظهرت وجود جزيئات RNA دائرية ذات وزن جزيئى منخفض ولكن لم يحدد (لغاية ١٩٩٢). وكذلك لم يحدد هذا المرض هل هو من عزلة جديدة لهذا الفيرويد أم أنه فيرويد منفصل.

المسبب :

يتسبب مرض الموزايك الكامن فى الخوخ عن فيرويدPeach Latent Mosaic Viroid ويكتب PLMVd. لقد درس تتابع هذا الفيرويد فوجد أنه يتكون من جزئ RNA دائرى به ٣٣٧ نيوكليتيدة والتى تأخذ الشكل المتفرع عندما تنفرد فى نموذج أقل طاقة حرارية حرة. يظهر فى هذا الفيرويد (PLMVd) تماثل محدود بالنسبة للفيرويدات الأخرى وكذلك بالنسبة للفيروسايدات، ولكنه لا يحوى أى من صفات التتابع المركزى المحفوظ لأى من تحت المجموعات النموذجية للفيرويدات. وعلى أية حال فإن تتابع جزء من الفيرويد حوالى الثلث تقريباً به عناصر مطلوبة لتتشكل فى ال RNAs من كلا القطبين لتركيبات رأس المطرقة وهذه التركيبات هى التى تقوم بعملية الإنشطار الذاتى كما فى فيرويد ضربة الشمس فى الأفوكـادو ASBVd وفى بعض الفيروسايـدات. إن الخيـط الموجـب والسالـب من RNA الجزئى وكامل الطول من نسخ PLMVd تحتوى تركيبات رأس المطرقة وتظهر الإنشطار الذاتى خلال النسخ وبعد التنقية كما هو متوقع من هذه التركيبات.

إن الدراسات الكاملة على هذا الفيرويد أثبتت أن فيرويد PLMVd يجب أن يضم إلى تحت مجموعة فيرويدات يمثلها ASBVd والتى تتميز أفرادها بمقدرتها على الإنشطار الذاتى فى المعمل وأحياناً فى الطبيعة خلال تركيبات رأس المطرقة. وبالنظر إلى شجرة النشوء فى الفيرويدت (هذه الشجرة موجودة فى مراجع تصنيفات الفيرويد) فلقد إقترح فيها أن PLMVd والفيرويد ASBVd يمكن أن تمثل حلقة تطور ونشوء بين الفيرويدات والفيروسايدات.

يمكن أن ينقى فيرويد PLMVd بعد خطوتين من ال PAGE ويمكن أن يتحصل على ١ ـ ٢ ميكوغرام من الفيرويد من كل كيلوغرام ورق خوخ طازج.

كذلك يمكن الحصول على الفيرويد ثانية من الثمار الحديثة المجموعة فى نهاية طور الأزهار، ولكـن الكمية المتحصـل عليهـا من هذه الثمـار تكـون أقل منها فى الأوراق. الفيرويـد لا يهاجم أى مـن Gynura aurantiaca ، Cucumis sativus ، C. morifolium و L. esculentum .

لا يوجد تماثل تتابع مشترك بين فيرويد PLMVd وفيرويد CEVd العضو الممثل لتحت مجموعة فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd ولا مع ASBVd العضو الممثل لمجموعة A فى الفيرويدات. ومن ناحية أخرى مع أن PLMVd يختلف كلية فى تتابعه عن ASSVd ، إلا أن الفيرويدين يبـدو أنهما يشتركان فى قليل من تماثل التتابع. كذلك هناك تماثـل تتابع محدود موجود بين PLMVd والفيرويد HSVd .



شكل رقم ٨٣ :

أعراض الإصابة بفيرويد PLMVd على أشجار الخوخ ذات عمر سبعة سنوات.



شكل رقم ٨٤ :

أعراض إصابة أوراق الخوخ صنف GF - 305 بالسلالة الشديدة من فيرويد PLMVd والتى هى D - 168.

تتابع النيوكليتيدات فى فيرويد PLMVd :

باستعمال تداخلين Overlapping وطول كامل من كلونات cDNA من الفيرويد PLMVd إحداهما يحصل عليه بواسطة برايمر Primer (26 - mer) على المواقع بين ١٩٣ و ٢١٨ والثانية حصل عليها بواسطة برايمر ٢ (34 - mer) بين المواقع ٩١ ــ ١٢٤ ، إختبرت ودرست مواقعها فى الاتجاهين. إن كلونات cDNA الثانوية جعلت من الممكن تصحيح التتابع المتطابق بنهاية`5 للبرايمر الأول. إن شكل ٨٥ يظهر التركيب الأولى للفيرويد PLMVd والذى هو RNA دائرى يتكون من ٣٣٧ نيوكليتيدة تتألف من ٩٠ G بنسبة ٢٦,٧ ٪ و ٨٧ C بنسبة ٢٥,٨ ٪ و ٨٠ A بنسبة ٢٣,٧ ٪ و ٨٠ U بنسبة ٢٣,٧ ٪. وبالتالى فإن الفيرويد يحتوى من G + C نسبة ٥٢,٥ ٪ وهى أقل من تلك الموجودة فى الفيرويدات الأخرى حيث تصل ٥٦ ــ ٦٠ ٪ باستثناء فيرويد ASBVd حيث تصل فيه ٣٨ ٪.

عند مقارنة تتابع الفيرويد PLMVd مع الفيرويدات النموذجية ومع بعض الفيروسايدات وجد أنه مع أن هذا الفيرويد يشارك تماثلات التتابع مع جميع الفيرويدات النموذجيـة والفيروسايـدات، إلا أن هـذه التماثلات تكون محدودة ولا تشمل التتابع عال الحفظ الذى يميز المنطقة المركزية لأفـراد تحـت مجموعة B_1. وعلى أية حال فإن الخيط السالب والموجب من RNAs للفيرويد PLMVd لا تمتلك التتابع المحفوظ من تركيب رأس المطرقة الذى يحدث فيه الإنشطار الذاتى من RNAs فى الفيرويد ASBVd وفى بعض RNA للفيروسايدات.

التركيب الثانوى المقترح للفيرويد PLMVd :

فى البحوث التى أجريت على التركيب الثانوى للفيرويد PLMVd بأقل طاقة حرة of lowest free energy أدت إلى ظهور تركيب غير متوقع له نقطتى تفرع والذى يخرج منها ٣ ـ ٥ أذرع، بينما مواصفات التركيب شبه العصوى وجدت فى جميع الفيرويدات النموذجية باستثناء الفيرويد الكامن فى حشيشة الدينار hop latent Viroid والذى له تركيب ذو شعبتين أكثر ثباتاً إلى حد ما من الشكل شبه العصوى الذى من المفروض الحصول عليه. إن تطبيق نفس الوضع على حالة ASBVd أدى أيضاً إلى تكوين شكل شبه عصوى ولكن بشعبة قصيرة على واحدة من نهاياته وهذا يتفق مع النتائج السابقة.

فى التركيب الثانوى المقتـرح للفيرويد PLMVd فإن تـزاوج نيوكليتيـداته تمثل ٧١,٢٪ من المجمـوع حيث شملت ٥٢,٥٪ G + C و ٤٠,٨٪ A + U و ٦,٦٪ G + U.

تركيب رأس المطرقة للفيرويد PLMVd :

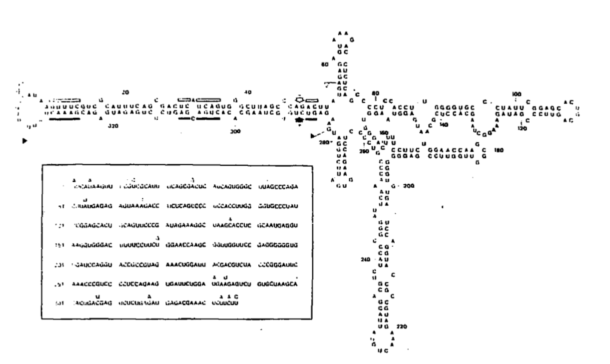
يظهـر فى شكـل ٨٦ أنه فى PLMVd RNA أن الأقطاب الموجبة والسالبة فيها

١٣ مركز محفوظ معاً مع عناصر أخرى تميز تركيبات رأس المطرقة المسئول عن تفاعل الإنشطار الذاتى فى المعمل فى الفيرويد ASBVd. إن كلا تركيبى رأس المطرقة للفيرويد PLMVd يكون داخلاً فى قطعة تمثل تقريباً ثلث تتابع الفيرويد ولها سيقان ثابتة جداً رقم III فى شكل ٨٦ ذراع قصير يتحلق خارجياً فى نهاية ساق I و II مشابهاً فى هاتين الحالتين تركيبات رأس المطرقة فى الفيروسايدات والمرافقات الفيرويدية أكثر من تشابهها مع الفيرويد ASBVd.

ومن المهم أن نذكر هنا أن استبدال القواعد الموجودة فى الكلونة الثانوية للفيرويد PLMVd فى منطقة تركيب رأس المطرقة إما أن لا يؤثر على ثبات ساق II و III أو أنه يتمركز فى العروات. إن التركيب السالب والموجب لرأس المطرقة يشارك كثيراً فى تماثل التتابع.

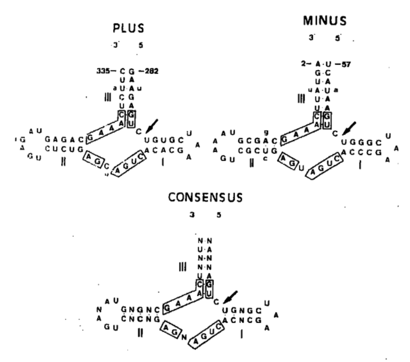
موقع الفيرويد PLMVd بين الفيرويدات والفيروسايدات:

إن شجرة نشوء وارتقاء الفيرويدات تنسب الفيرويد PLMVd إلى أفراد تحت مجموعة الفيرويدات النموذجية حيث أنه ينسب إلى مجموعة ASBVd. ويمكن القول باختصار أن الأصل المشترك المفترض لنشوء الفيرويدات والفيروسايدات يمتد ليشمل PLMVd بالإضافة إلى فيرويد Coleus blumei Viroid 1 ويبدو أن PLMVd بعيد عن الفيرويدات النموذجية ويكون قريب جداً من ASBVd ويكون قريب بشكل خاص من الفيروسايد vLTSV حيث أن الحمض النووى فى ASBVd وفى vLTSV له تركيب رأس المطرقة فى كلا القطبين.



شكل رقم ٨٥ :

التركيب الثانوى الناتج من استعمال الطاقة الحرة المنخفضة لفيرويد PLMVd. نطاقات السالب الموجب للإنشطار الذاتى محددة بالإعلام. إن المراكز الثلاثة عشر المحفوظة موجودة فى جميع تركيبات رأس المطرقة ويشار إليها بشرطات. مراكز الإنشطار الذاتى المتوقعة مشار إليها بأسهم. رؤوس الأسهم الصغيرة تشير إلى الأقطاب الموجبة والسالبة. إن التركيب الأولى للفيرويد PLMVd باختلافات التتابع الناتجة من استبدال القواعد مشار إليها فوق التتابع. إن مواقع Pst I و Sma I موجودة بين المواقع ١٠٩ ـ ١١٤ و ٢٤١ ـ ٢٤٦ بالترتيب.



شكل رقم ٨٦:

تركيب رأس المطرقة من الموجب والسالب فى PLMVd RNAs مع أسهم مشيرة إلى مواقع الإنشطار الذاتى. المواقع المحفوظة فى علب بخط سميك هى التتابع المحفوظ فى جميع تركيبات رأس المطرقة فى مواقع متشابهة. الحروف السفلية تدل على قواعد مستبدلة. N تعنى مواقع غير محفوظة. إن تركيب رأس المطرقة يجمع بين الأفراد السالبة والموجبة من PLMVd وتكون دائماً موجودة. إن زوج القواعد الطرفى فى الساق III من تركيب رأس المطرقة من PLMVd RNA الموجب لا يوجد فى التتابع المأخوذ من كلون PLMVd الثانوى حيث أن C على الموقع ٣٣٥ قد استبدل بـ A.

الصفات العامة للفيرويد:

١ ـ الصفة الأولى:

إن الصفة الجديرة بالذكر لفيرويد PLMVd هى مقدرته على تشكيل تركيب رأس المطرقة والتى هى من مميزات الفيروسايدات ولكنها لغاية الآن معروفة فى فيرويد واحد هو ASBVd. إن فيرويد PLMVd يستطيع مثل ASBVd أن يتولى القيام

بتركيب رأس المطرقة فى الأحماض النووية RNAs فى كلا القطبين، مع أنه بالنسبة للتركيبات المزدوجة لرأس المطرقة قد إفترض بأنها تعمل فى تفاعلات الإنشطار الذاتى (خاصة فى القطب الموجب) نظراً لأن تركيب رأس المطرقة المفرد فى الفيرويد ASBVd غير ثابت. وعلى العكس من ذلك فإن تركيبات رأس المطرقة فى الفيرويد PLMVd ثابتة وأن الأحماض النووية RNAs تحتوى فقط مجموعات من تتابع PLMVd ذات كفاءة قطبية فى الإنشطار الذاتى خلال النسخ، تدل على أن هناك تفاعلات متماثلة أكثر احتمالاً لأن تقع خلال ميكانيكية تركيب الجزئ. إن تركيبات رأس المطرقة للسالب والموجب فى PLMVd أكثر علاقة وقرباً من بعضها البعض أكثر منها فى أى من تركيبات رأس المطرقة المعروفة الأخرى، هذه الحالة قد لوحظت أيضاً بين تركيبات رأس المطرقة فى الفيروسايد vLTSV. زيادة على ذلك فإن الثلاثة عشر مركزاً المحفوظة من السالب والموجب فى رؤوس المطرقة للفيرويد PLMVd وتماثلها فى مواقع الإنشطار الذاتى (مفصولة بواسطة ٩٦ موقع نيوكليتيدى) تحدث فى مواقع متعاكسة فى التركيب المفترض فى الموجب والسالب من PLMVd RNAs وأيضاً تحدث فى vLTSV، كذلك فإن مواقع الإنشطار الذاتى فى vLTSV تكون مفصولة بستة نيوكليتيدات فقط وإن جزء من نطاقات الإنشطار الذاتى تكون متداخلة. إن التركيبات من أقل طاقة حرة لأى من PLMVd RNA يحتوى تركيبات رأس المطرقة وبناء على ذلك تكون غير متوقعة الإنشطار الذاتى. هذه التكوينات تكون غالباً موجودة فى النسخ النقية الكاملة بالإضافة إلى الفيرويد الدائرى المعدى. إختيارياً فإن التكوينات الفعالة يمكن أن تتشكل خلال النسخ وتحت الإنشطار الذاتى قبل أن يتم بناء RNA وأن معظم التركيبات غير الفعالة الثابتة يمكن أن تتشكل. ومن المهم أن نذكر هنا أن هناك تماثل بين مواقع النيوكليتيدات المشكلة من ساق I و II من تركيبات رأس المطرقة فى PLMVd السالب والموجب، بشكل خاص من تلك التى هى قريبة من العروة مفردة الخيط الداخلية أو الأساسية والمواقع المماثلة من تركيبات رأس المطرقة فى PLMVd (الموجب) والموجب فى فيروسايد البرسيم المنقط والموجب والسالب فى فيروسايد vLTSV.

٢ ـ الصفة الثانية:

إن الصفة الثانية من صفات PLMVd الجديرة بالاهتمام هى نموذج التركيب الثانوى ذو الطاقة الحرة المنخفضة حيث يظهر فيه نقطتى تفرع، غير مشكلة، بالتالى للتركيبات شبه العصوية التى تميز معظم الفيرويدات النموذجية. إن التركيب المتفرع للفيرويد PLMVd، يمتلك، مع ذلك، ثبات ضمن المدى لتلك التركيبات شبه العصوية للفيرويدات النموذجية كما يستدل من القيم المتحصل عليها بالمقياس ΔG / N. إن هذا النوع من التركيب المتفرع قد ذكر فى بعض الفيرويدات والفيروسايدات، مع أنه فى حالة الفيرويد PLMVd فإن عدد التفرعات يكون أكبر وهى أطول أيضاً. إن الأهمية الفسيولوجية لهذا التركيب المفترض غير معروفة (١٩٩٤) مع أن الجزء المحتوى التتابع الداخل فى تركيبات رأس المطرقة يكون ثابت جداً (هناك قطعة مشابهة ثابتة يمكن أن تتشكل فى القطب السالب) وكما قلنا سابقاً من الممكن أن يحفظ جزئيات الفيرويد الدائرى من الإنشطار الذاتى.

٣ ـ الصفة الثالثة:

كما ذكرنا سابقاً فإن فيرويد PLMVd يصيب الخوخ **Prunus persica** وإن أكثر السلالات شدة هى D - 168 وإن أكثر الأنواع حساسية للمرض هى شتلات النوع GF - 305. كذلك فإن هذا الفيرويد PLMVd يشابه الفيرويد ASBVd فى كونه لا يحتوى تتابع GAUUUU المحفوظة فى جميع الفيروسايدات فى موقع مشابه فى تركيبها الثانوى المفترض والذى يمكن أن يلعب دوراً فى تناسخ هذه الفيروسايدات.

٤ ـ الصفة الرابعة:

إن المدى العائلى المحدود جداً للفيرويد PLMVd وهو المسبب لمرض الموزايك الكامن فى الخوخ **Prunus persica** فقط، هذا يذكرنا بالصفة المماثلة فى

فيرويد ASBVd والذى يسبب ضربة الشمس فى الافوكادو فقط **Persea americana** وبعض الأنواع من العائلة الغارية (Lauraceae) كذلك فإنهما يشتركان فى إظهار بعض الأعراض المتشابهة. إن فيرويد PLMVd لا يسبب ظهور الأعراض على الأوراق إلا بعد أن تصل الشجرة لعمر خمسة سنوات وبقية الأعراض تظهر مبكراً. كذلك فإن الأعراض المتكونة بسبب ASBVd على الأوراق لا تكون منتظمة أيضاً، وبعض الإصابات تكون كامنة أو بدون أعراض على الأوراق.

٥ ـ الصفة الخامسة:

إن التتابع فى الفيرويد PLMVd فيه تماثل جزئى بالنسبة للفيرويدات الأخرى بالإضافة إلى بعض الفيروسايدات ونتيجة لدراسة شجرة أصل ومنشأ الفيرويدات (ذكرناها سابقاً) وجد بأن هناك علاقة بين الفيرويد PLMVd والفيروسايد vLTSV أيضاً فإن طول تفرع الفيرويد يكون حقيقة تدل على المنشأ الطويل المنفصل لهذا التتابع وعلى الصفات الحيوية التى تثبت بأن هذا الفيرويد فعلاً يتبع الفيرويدات وليس الفيروسايدات، ولكنه يمثل حلقة وصل أو حلقة تطور واضحة جداً بين الفيرويدات والفيروسايدات أكثر من دور الفيرويد ASBVd فى تمثيل حلقة الربط هذه.

٦ ـ الصفة السادسة:

إن فيرويد PLMVd هو الفيرويد الثانى من تحت مجموعة الفيرويدات التى تتميز بأنها تمتلك تركيبات رأس المطرقة المسئول عن الإنشطار الذاتى فى المعمل والذى من المحتمل أن يلعب أيضاً دوراً فى تجهيز بوادئ ال Oligomeric فى الطبيعة. إن الفيرويد ASBVd هو النموذج المثالى لتحت هذه المجموعة والتى أعطيت إسم avsunviroid.

٧ ـ الصفة السابعة:

ينتشر فيرويد PLMVd فى المزارع النامية فيها شجيرات الخوخ وينتشر فى مساحات واسعة من هذه المزارع، إلا أنه لا يوجد دليل على الانتقال الميكانيكى فى

الحقل عن طريق الأيدى أو الأدوات الزراعية الملوثة إلا أن هذا الرأى يحتاج إلى دراسات أوسع. لقد ثبت أن هذا الفيرويد ينتقل بواسطة حشرة المن **Myzus persicae** ولكن الظروف المحيطة بانتقال هذا الفيرويد بهذه الحشرة لا تزال قيد البحث.

٨ ـ الصفة الثامنة:

يمكن اكتشاف الفيرويد PLMVd بأى من الطريقتين ١ ـ طريقة PAGE وهى أكثر سرعة ومتخصصة فى إكتشاف الفيرويد الدائرى ولكنها لا تعمل إكثار لكمية الفيرويد الموجودة فى العينة، وبالتالى يمكن أن تفشل هذه الطريقة فى كشف الفيرويد فى المستخلص إذا كان كميته منخفضة (مثلاً فى حالات الإصابة الحديثة). ٢ ـ من ناحية أخرى فإن الإختبارات الحيوية مع أنها تتطلب وقت طويل إلا أنها أكثر حساسية وهى الطريقة الثانية فى الكشف عن الفيرويد. إن فهرسة بادرات الخوخ سلالة GF - 305 أظهرت أن الفيرويد PLMVd ينتشر جيداً فى جميع أعضاء النبات، الفروع الحديثة والأغصان القديمة والأوراق والجذور. كذلك فقد أمكن اكتشاف الفيرويد بطريقة PAGE فى مختلف أجزاء النبات المصابة بالفيرويد فى شجيرات GF - 305 منها الجذور، نصل الأوراق، العروق الرئيسية، القلف وخشب الساق. كذلك فإن طريقة PAGE تسمح بالكشف عن الفيرويد فى الثمار الحديثة والناضجة. لا يتواجد هذا الفيرويد فى البذور وبذلك فهو لغاية (١٩٩٤) لم يثبت أنه ينتقل بالبذور.

ب ـ مرض تنقر ثمار الخوخ والبرقوق

Dapple Fruit Disease of Plum and Peach

مقدمة:

لقد إكتشف مرض جديد على. البرقوق **Prunus salicina** فى اليابان وذلك بواسطة العالم Terai سنة ١٩٨٥. أعراض هذا المرض على شكل بقع كبيرة حمراء منتشرة على الثمار خاصة الصنف Taiyo عند النظر للثمار من على بعد

يلاحظ وكأنها منقرة نظراً لانعكاس الأشعة من البقع المختلف عن إنعكاسها من سطح الثمرة. ينتقل المرض عن طريق التطعيم وسمى مرض تنقر ثمار البرقوق Plum Dapple Fruit Disease. بعد ذلك تم اكتشاف مرض آخر يصيب البرقوق يتميز بظهور لون أحمر مصفر فى لحم الثمرة صنف Soldam وينتشر بشكل واسع فى اليابان وسمى مرض إصفرار ثمار سولدم Soldam Yellow Fruit Disease وهذا المرض وصفه أيضاً العالم Terai سنة ١٩٨٧. يبدو أن كلا المرضين يتسبب عن نفس الكائن الممرض. ونظراً لأن أشجار البرقوق السليمة صنف Taiyo التى حقنت بالتطعيم من صنف سولدم الذى عليه أعراض مرض إصفرار ثمار سولدم، تكشف على الثمار أعراض تنقر والعكس بالعكس. هذا يدل على أن هناك علاقة بين المسببين. هناك أعراض مماثلة تتكون من بقع كبيرة شاحبة على ثمار الخوخ **Prunus persica** على الصنف Asama - Hakutou فى اليابان.

لقد اكتشف فيرويد مسبب مرض تنقر الثمار على الصنف Taiyo فوجد أنه مشابه لفيرويد تقزم حشيشة الدينار HSVd السلالة التى تصيب العنب وهو ذو تماثل تتابع عال نسبياً بالنسبة إلى مجموعة فيرويد HSVd.

مسبب المرض:

لقد عزلت الفيرويدات من أشجار البرقوق **Prunus salicina** المصابة بمرض تنقر ثمار البرقوق Plum dapple fruit disease ومن أشجار الخوخ **Prunus persica** المظهرة أيضاً أعراض تنقر الثمار. عند حقن الفيرويدات ميكانيكياً فى نباتات العائلة القرعية تظهر أعراض نموذجية للأعراض التى يسببها فيرويد تقزم حشيشة الدينار HSVd فى نباتات القرعيات. إن التركيب الكامل لتتابع النيوكليتيدات فى عزلة الفيرويد من الخوخ ومن البرقوق تسمى عزلة AF كانت متماثلة وفيها ٢٩٧ نيوكليتيدة ذات تماثل تتابع ٩٣,٦ ٪ بالنسبة للفيرويد HSVd عزلة حشيشة الدينار. هناك عزلة أخرى من الخوخ تسمى عزلة (A9) تكون من ٢٩٧ نيوكليتيدة ولكن تماثل التتابع فيها ٩٩,٧ ٪ بالنسبة للفيرويد HSVd عزلة حشيشة الدينار، وإن فيها

نيوكليتيدة واحدة تغير مكانها. هذه النتائج أدت إلى القول بأن هذه الثلاثة فيرويدات هى سلالات من فيرويد HSVd وتسمى HSVd - Plum، HSVd - plum AF و HSVd - Peach A9. إن الفرق الوحيد بين هذه العزلات وعزلة HSVd - hop (المعزولة من حشيشة الدينار) موجود فى جزء اليد اليسرى من الجزئ متضمنة الجزء السفلى والمنطقة المركزية المحفوظة. ولقد تأكدت الأبحاث فى اليابان بأن هذه العزلات هى المسببة لمرض تنقر الخوخ ومرض تنقر البرقوق.

الصفات العامة للعزلات المسببة للأمراض:

لقد تبين أن كلا الفيرويدين المعزولين من البرقوق والخوخ هما قريبا العلاقة جداً مع فيرويد HSVd على أساس أعراضهما المرضية على نباتات العائلة القرعية وعلى التحليل بواسطة PAGE وطريقة تهجين الجزئ. إن أعراض هذه الفيرويدات على نبات الخيار صنف Suyo كانت نفسها دائماً تتسبب عن HSVd عزلة حشيشة الدينار. إن المدى العائلى لعزلة الفيرويد المأخوذة من البرقوق ليشابه المدى العائلى للعزلة من حشيشة الدينار ولكن عزلة البرقوق لا تهاجم الطماطم، فى حين أن عزلة حشيشة الدينار تصيب الطماطم بدون إحداث أعراض. إن عزلة الخوخ (A9) تختلف بنيوكليتيدة واحدة عن عزلة حشيشة الدينار وتسمى فيرويد حشيشة الدينار المعزول من الخوخ HSVd - peach أما التى من البرقوق تسمى فيرويد حشيشة الدينار المعزول من البرقوق HSVd - plum.

بالاعتماد على نتائج تجارب الحقن بالعصارة والتحليل بواسطة PAGE يبدو أكثر احتمالاً بأن HSVd - plum تسبب مرض تنقر الثمار النموذجى فى البرقوق صنف Taiyo، كذلك فإن العزلة نفسها تسبب تنقر الثمار على الخوخ. أما HSVd - peach (AF) أو عزلة HSVd - peach (A9) يبدو أنهما مترافقتان مع أعراض تنقر الثمار فى الخوخ والبرقوق. إن هاتين العزلتين فيهما تتابع نيوكليتيدات مختلف. إن العزلة HSVd - peach (AF) المعزولة من الخوخ تظهر أعراض تنقر شديدة جداً على الخوخ ولكن HSVd - peach A9 المعزولة من الخوخ تظهر أعراض تنقر

بسيطة جداً على البرقوق. ولكن يجب أن نذكر هنا أن هناك احتمال حدوث خطأ في طرق عزل هذه العزلات أو أن هناك فيرويد آخر لم تتمكن التجارب من اكتشافه له دور مهم فى إظهار الأعراض (ومرافق أو غير مرافق للعزلات السابقة) موجود فى أشجار الخوخ أو البرقوق. ونظراً لأن HSVd قد اكتشف على نباتات حشيشة الدينار فى اليابان فإن هناك مجموعة من العوامل المرضية المشابهة لهذا الفيرويد وتسمى مجموعة HSVd وهى منتشرة ومسببة أمراض فى أنواع مختلفة من أشجار الفاكهة مثل العنب، الحمضيات، الخوخ والبرقوق. بعض هذه السلالات من HSVd تسبب أمراضاً خطيرة على حشيشة الدينار، الخيار، البرقوق وأحياناً الخوخ ولكنها تصيب العنب والحمضيات بـدون إظهار أعراض (كامنة) ويمكن النظر إلى هذه النباتات أن لها دور مهم فى إظهار وبائية HSVd وتعتبر مصدر كبير وكثيف لإنتشار الفيرويد.

فيرويدات تحت الدراسة

١ ـ فيرويد تقزم الدخان البرى

Nicotiana glutinosa Stunt Viroid (NgSVd)

مقدمة :

يتعرض نبات الدخان البرى **Nicotiana glutinosa** إلى الإصابة بفيرويد تقزم الدخان البرى NgSVd، وتتميز أعراض الإصابة به وتظهر على شكل تدلى الأوراق، التقزم، المظهر الشجيرى أو العنقودى للنباتات وأحياناً يظهر نكروزز على أوراق النبات. بإجراء عملية التحليل بواسطة طريقة PAGE على مستخلصات النبات وجد أن هناك حمض نووى ذو وزن جزيئى منخفض له سرعة أكثر من سرعة فيرويد تقزم قمة الطماطم الهندى TBTVd. لقد تأكد من هذه العملية (PAGE) أن مرض تقزم الدخان البرى يتسبب عن هذا الفيرويد. يختلف فيرويد NgSVd عن فيرويد تقزم قمة الطماطم الهندى فى المدى العائلى الذى يصيبه حيث أن فيرويد NgSVd يمكن أن ينتقل إلى:

1 - **Nicotiana clevelandii**
2 - **N. debneyi**
3 - **N. plumbaginifolia**
4 - **Luffa acutangula**
5 - **Cucumis sativus**
6 - **Cajanus cajan**
7 - **Vigna unguiculata**
8 - **Chenopodium amaranticolor**

ينفصل الحمض النووى RNA المعدى للفيرويد إلى حزمتين فى الجيل تدل الأولى على الشكل المستقيم للفيرويد وتدل الثانية على الشكل الدائرى. يبلغ الوزن الجزيئى للفيرويد ١,١ × ١٠⁰ دالتون.

الأعراض:

أولى أعراض هذا المرض تدلى الأوراق وهذا المظهر يحدث بعد ١٠ ـ ١٥ يوم من الحقن ويظهر على جميع النباتات المحقونة بالفيرويد. بعد ٢٠ ـ ٣٠ يوم يصبح ٨٠٪ من النباتات المحقونة متقزمة ذات مظهر شجيرى أو عنقودى، هذا المظهر يتكون نتيجة لتثبيط نموات القمم وكثرة نموات الفروع الجانبية المتكونة من البراعم الإبطية. بعد ٢ ـ ٣ شهور من الحقن تظهر الأعراض الثانوية وتبدأ على شكل نكروزز فى العروق الرئيسية فى الورقة ثم العروق الفرعية ثم تمتد إلى أسفل لتصل عنق الورقة ثم الساق. تفشل النباتات المصابة فى الإزهار وإذا أعطت أزهار تكون هذه الأزهار عقيمة.

إن تعبيرات الأعراض المرضية المتسببة عن الفيرويد NgSVd وتركيز هذا الفيرويد كلاهما يعتمد على درجة الحرارة والضوء. أثناء شهور الصف المشمسة (ذات الكثافة الضوئية العالية) والفترات الضوئية الطويلة بمتوسط ٩,٦ ساعة يومياً، وذات درجات الحرارة العالية ٤٠ ـ ٤٥°م، فإن كلاً من الأعراض الأولية والثانوية تظهر بسرعة أكثر حيث تحتاج الأعراض الأولية ١٦ ـ ٢٠ يوم أما الثانوية تحتاج ٥٠ ـ ٦٠ يوم وتكون الأعراض أكثر شدة فى كلتا الحالتين. أما فى فصول الشتاء ذات درجات الحرارة المنخفضة حوالى ٨ ـ ١٧°م وكثافة إضاءة منخفضة وإضاءة شمسية أقل من ٧,٨ ساعة، تظهر الأعراض الأولية معتدلة أو متوسطة وتحتاج ٢٠ ـ ٣٠ يوم حتى تظهر (بعد الحقن) ولا يتكشف نكروزز على أى من النباتات المحقونة تحت هذه الظروف. يكون متوسط معيار الفيرويد NgSVd ‏٠,١٦ ميكوغرام لكل غرام نسيج فى شهور الشتاء، يكون هذا المعيار ٠,٣٧ ميكوغرام / غرام نسيج نباتى فى شهور الصيف.

يصيب الفيرويد نباتات من العائلة البقولية (أول فيرويد يذكر فى هذا الموضوع) حيث يصيب جنس البسلة الهندية.

المدى العائلى للفيرويد:

نباتات الدخان N. glutinosa المحقونة بالفيرويد (NgSVd) المستخلص من النباتات المصابة يظهر عليها جميع مواصفات الأعراض المرضية المذكورة سابقاً وتبقى النباتات عقيمة. أمكن نقل الفيرويد بنجاح إلى عدة أنواع من العائلة الرمرامية Chenopodiaceae والقرعية والبقولية والباذنجانية. وهى كالآتى:ـ

١ ـ Chenopodium amaranticolor تسبب الإصابة الفيرويدية على هذا النبات ظهور بقع موضعية شاحبة يتبع ذلك تدلى الأوراق ثم موزايك متبرقش على الأوراق وتقزم فى النباتات.

٢ ـ Cucumis sativus. يظهر على الأوراق بقع كبيرة شاحبة وتتجعد قمم الأوراق وتنثنى لأسفل وكذلك تلتف حواف الأوراق إلى أسفل.

٣ ـ Luffa acutangula. يظهر على الأوراق موزايك متبرقش معتدل مع حواف غير منتظمة وتجعد قمم وحواف الأوراق إلى أسفل.

٤ ـ N. clevelandii. يظهر على النبات أعراض تدلى وشحوب الأوراق وتقزم ومظهر القمة الشجيرية فى النبات.

٥ ـ N. debneyi يظهر تدلى ونكروزز على الأوراق.

٦ ـ N. plumbaginifolia. يظهر أعراض شديدة تتمثل فى التفاف الأوراق إلى أعلى.

٧ ـ Nicotiana sp.. لا يتكون أزهار على أنواع هذا الجنس.

٨ ـ Cajanus cajan. هذا أول جنس من العائلة البقولية يصيبه الفيرويد. يظهر على النباتات المصابة نكروزز فى العروق على الأوراق المحقونة أما الأوراق

غير المحقونة فى نفس النبات يظهر عليها بقع على شكل بثرات على الأوراق الثلاثية.

٩ ـ Vigna unguiculata تظهر الأعراض على شكل بثرات على الأوراق ونكروزز العروق بعد ١٥ ـ ٢٠ يوم من الحقن.

لا يصيب هذا الفيرويد نباتات الطماطم التى هى عامل كاشف شائع لكثير من الفيرويدات وهذه الصفة تجعله يتميز عن كثير من الفيرويدات التى تهاجم الطماطم أو تكون الطماطم كاشف لها.

بقية صفات الفيرويد لا تزال تحت الدراسة.

نشرة هذا البحث فى مجلة Plant Disease سنة ١٩٩١ مجلد ٧٥ عدد ١٠ صفحة ١٠٦٨ إلى ١٠٧١.

٢ ـ فيرويد تقزم القرنفل

Carnation Stunt Viroid

مقدمة:

كان أول وصف لهذا المرض (مرض تقزم القرنفل) فى الولايات المتحدة الأمريكية سنة ١٩٨٣ من قبل العالم Lominelو Morris وإن التحليل بواسطة طريقة PAGE أكد أن التركيب الدائرى للحمض RNA الفيرويدى ذو وزن جزيئى حوالى ٨٠٠٠٠ ـ ٨٥٠٠٠ دالتون. ينتشر هذا المرض فى كل من إيطاليا وأسبانيا.

الأعراض:

أعراض المرض تكون على شكل تقزم، تشوهات ونموات كثيرة غير عادية للساق، إنخفاض عقد الإزهار والأزهار التى تتكون تكون مشوهة. الإختبارات التى أجريت فى إيطاليا على العينات المصابة أظهرت أن RNA الصغير المرافق للمرض

موجود فى شكلين دائريين أحدهما بطئ والآخر سريع فى الهجرة الكهربائية فى الجيل يشار إليهما Carnation Stunt Associated Viroids الأول يسمى (Car SAV - slow) أما الأخر فيشار إليه (Car SAV - fast). الفيرويد ذو الشكل البطئ Car SAV - slow قدر حجمه فوجد أنه يتكون من ٢٨٠ نيوكليتيدة وإن جزء من هذا التتابع تبين أنه يمكن أن ينثنى ويأخذ تركيب رأس المطرقة كتلك المتوقع أنها تعمل إنشطار ذاتى فى المعمل للفيرويدين النباتيين ASBVd و PLMVd وفى فيروسايدات النبات ونسخ من فيروسايد السمندل Newt Satellite 2 DNA.

الكائن المسبب:

لم يتأكد بعد فيما إذا كان مسبب هذا المرض فيرويد أو فيروسايد لأن فيه صفات كثيرة مشتركة بين هاتين المجموعتين من المسببات المرضية. لذلك لا يشار إليه بأنه فيرويد بل بأنه مرافق لتقزم القرنفل (Car SAV) وإذا قلنا فى هذا الشرح كلمة فيرويد فإن ذلك من باب المجاز فقط.

درس تتابع نيوكليتيدات RNA الدائرى المعزول من نبات القرنفل المصاب بالتقزم وتبين أنه يتكون من ٢٧٥ نيوكليتيدة تتخذ شكل التركيب الثانوى المتفرع عند أقل حرارة حرة. إن كل من الخيوط السالبة والموجبة لهذا الحمض تستطيع أن تشكل تركيب رأس المطرقة المفترض بأنه وسيط فى الإنشطار الذاتى فى المعمل. إن النسخ السالبة كاملة الطول والأخرى غير الكاملة من فيرويد تقزم القرنفل الدائرى الشاملة تركيب رأس المطرقة تظهر عملية الإنشطار الذاتى خلال النسخ وبعد التنقية، هذا يدل على دخول تركيب رأس المطرقة المفرد فى تفاعل الانشطار الذاتى. أما فى حالة النسخ الموجبة فإنه فقط الدايمرك Dimeric RNA وليس ال monomeric عندها كفاءة الانشطار الذاتى خلال النسخ والتنقية وهذا يقوى بشدة دخول رأس المطرقة المزدوج فى الإنشطار الذاتى أكثر من إنشطار النطاق المفرد. وعلى أية حال فإن نسخ موجبة من monomeric تنشطر ذاتياً بعد التنقية بمعدل منخفض فى تفاعل معتمد على التركيز والذى أكثر احتمالاً بأن يحدث خلال ميكانزم بين

الجزيئات Intramolecular mechanism. إن مقارنة تحليل التتابع قد أظهر أن فيرويد تقزم القرنفل الدائرى يشترك فى تشابهات كثيرة مع بعض الفيرويدات أو الفيروسايدات. إن الحمض النووى RNA الصغير الدائرى والذى يمكن أن يكون فيرويد أو فيروسايد هو المسبب لأعراض التقزم فى القرنفل.

العزلة الأسبانية:

الدراسات التى أجريت على هذا المرض فى أسبانيا ذكرت أن RNA الدائرى الذى يصيب القرنفل يتكون من ٢٧٥ نيوكليتيدة وهو قريب الشبه مع تلك الفيرويدات المعروفة فى ايطاليا والولايات المتحدة ومع أن كثير من الأبحاث قد أكدت بأن هذا المسبب فيرويد إلا أن هناك بعض التحفظات على ذلك.

استمرت الدراسات على عزلة أسبانيا ذو الحجم ٢٧٥ نيوكليتيدة ووجد أن هذه النيوكليتيدات تتكون من ٨٤ G بنسبة ٣٠,٥٪، ٥٧ C بنسبة ٢٠,٧٪، ٦٢ A بنسبة ٢٢,٥٪ و ٧٢ U بنسبة ٢٦,٥٪ وبالتالى يكون G + C بنسبة ٥١,٢٪. إن التركيب الثانوى المتكون على أقل طاقة حرة يميل إلى التكوين المتفرع وأن ٧٠,٥٪ من مراكزه تكون فى أزواج بحيث تكون GC بنسبة ٤٧,٤٪ و AU بنسبة ٣٦,١ و GU بنسبة ١٦,٥٪.

إن التحليل المقارن لتركيبات رأس المطرقة للفيرويد Car SAV يبين أن هذا الفيرويد يمكن أن يشكل تركيبات رأس المطرقة فى كل من قطبى الشريطين كما هو الحال فى فيرويد ASBVd وفيرويد PLMVd وفيروسايدات sLTSV وsBYDV. كما وأن التكوينات الناشئة من أقل طاقة حرة من المونومرك الموجب والسالب والداى مرك السالب فى Car SAV RNAs لا تحتوى تركيبات رأس المطرقة وبالتالى فإن النسخ النقية المتوافقة غير متوقع لأن تعمل إنشطار ذاتى مالم تتعرض إلى حرارة قبل المعاملة لتشجيع ظهور التكوينات البديلة المحتوية على تركيبات رأس المطرقة.

إن المونومرك السالب والداى مرك الموجب فى Car SAV RNAs يكون فيهما الإنشطار الذاتى خلال النسخ وبعد التنقية أكثر احتمالاً من أن يكون خلال تركيبات رأس المطرقة المفرد والثنائى بالترتيب، وهذا يشبه ASBVd RNA. كذلك فإن تركيب رأس المطرقة من Car SAV RNA يمتلك الحلزون (اللولب) رقم ٣ وكذلك ثلاثة عروات مشابهة فى RNA فى السمندل (بعض الحيوانات). وتمشياً مع نظريات عدم الثبات لتركيب رأس المطرقة فإنه من الصعب اكتشاف الإنشطار الذاتى فى المونومرك الموجب لـ Car SAV RNA خلال النسخ، بينما الإنشطار الذاتى فى الداى مرك الموجب لـ Car SAV RNA يحدث بكفاءة خلال النسخ وبعد التنقية وهذا يؤكد دخول تركيب رأس المطرقة المزدوج فى هذا التفاعل. وهذه النتائج تنطبق مع نتائج الأبحاث على بعض الفيروسايدات.

ولغاية سنة ١٩٩٤ لا يوجد تأكيدات على أن Car SAV هو من ضمن الفيرويدات أو من ضمن الفيروسايدات والأبحاث القادمة إن شاء الله هى التى سوف تؤكد ذلك.

نشر هذا المقال فى مجلة Nucleic Acid Research, 1992, Vol. 20. No. 23: 6323 - 6329.

٣ـ فيرويد لفحة أوراق القمح

Wheat Leaf Blight Viroid

ذكرت مجلة China J. Virology الصادرة سنة ١٩٨٧ فى الصفحة ١٧٣ - ١٧٦. أن هناك فيرويد يصيب القمح يؤدى إلى لفحة الأوراق وإصفرارها وهو فيرويد كامن فى الحبوب ويسبب المرض المسمى Seed - borne Yellow Leaf Blight Disease. تظهر أعراض هذا المرض على شكل مناطق صفراء متطاولة على نصل الورقة، يظهر فى منتصف هذه المناطق بقع متحللة ذات لون بنى. إذا كانت الأعراض شديدة تظهر نباتات القمح وكأنها ملفوحة. يحدث التباس فى تشخيص هذه الأعراض مع بعض الإصابات الفطرية، إلا أن الفحص الميكروسكوبى يضع تمييزاً لذلك.

بالفحص الميكروسكوبى للخلايا فى منطقة الإصابة (الصفراء قبل التحلل) يظهر تحطم وإختفاء أجزاء من الغشاء النووى ويحدث تغيرات فى السيتوبلازم بالقرب من النواة ويحدث تمدد فى قطر الأربطة بلازمودسيماتا Plasmodesmata ويصبح قطر بعضها أكبر من ١٠٠ نانوميتر.

٤ ـ فيرويد اللجستروم

Privet Viroid

فى المجلة الصينية السابقة ولكن فى عدد آخر. Chaina J. VIROLعدد رقم ٣ فى الصفحة ٥٣ ـ ٦١ الصادرة سنة ١٩٨٧. ذكرت أن نبات اللجستروم **Ligustrum compactum** يصاب بفيرويد ذو شكل دائرى مغلق ويتكون من عديد من قواعد الأزواج وأن وزنه الجزيئى ٠,٧ × ١٠^٥دالتون. وأن هذا الفيرويد لا ينتقل إلى نبات **Gynura aurantiaca**.

٥ ـ فيرويد الإصفرار المميت فى نخيل الزيت

Oil Palm Fatal Yellowing Viroid

ذكر هذا الفيرويد فى مجلة Fitopatol. BRAS 13 (4): 392 - 394 الصادرة سنة ١٩٨٨. تذكر هذه المجلة أن أعراض المرض المتسببة عن هذا الفيرويد فى أشجار نخيل الزيت **Elaeis guineensis** تظهر على شكل إصفرار على الأوراق يستمر هذا الإصفرار فى الزيادة حتى يشمل الورقة كلها وتموت.

٦ ـ فيرويد الموزايك المبرقش فى البسلة الهندية

Pigeon Pea Mosaic Mottle Viroid

لقد وجد أن هناك حمـض نووى RNA منخفض الوزن الجزيئى ١,٣ × ١٠^٥دالتون عزل من نباتات البسلة الهندية **Cajanus cajan** فى الهند ويسبب هذا الفيرويد مرض فى البسلة الهندية هو الموزايك المبرقش. تظهر الأعراض على شكل موزايك متبرقش فى الأوراق، صغر فى حجم الأوراق، تقزم النبات وعدم الإزهار. يمكن نقل هذا النبات بالحقن الميكانيكى ويصيب كل من:ـ

1 - **Nicotiana glutinosa** 2 - **N. clevelandii**

3 - **Chenopodium amaranticolor**

إن هذا الفيرويد يختلف عن فيرويد تقزم الدخان البرى الذى ذكر سابقاً N. glutinosa Stunt Viroid. إن هذا الفيرويد (فيرويد الموزايك المبرقش فى البسلة الهندية) أول فيرويد يذكر بأنه يصيب البقوليات.

هذا المقال فى مجلة J. of Phytopathology 137 (1): 55 - 60 الصادرة سنة ١٩٩٣.

٧ ـ فيرويد تقزم الأرقطيون

Burdock Stunt Viroid

ذكرت مجلة SCI SIN SER B 29 (2) 147 - 155 الصادرة سنة ١٩٨٦ أن نبات الأرقطيون **Arctium tomentosum** وهو من النباتات الطبية يتبع العائلة المركبة وتنتشر زراعته فى أوروبا والصين وكذلك النوع **A. lappa** يصابان بنوعين من الفيرويدات التى تسبب تقزم النبات وتبرقش الأوراق كما وأن الكالوس المتكون من الأوراق المريضة ينمو ببطء أكثر إذا قورن مع المتكون من الأوراق السليمة. كذلك فإن تكاثر إحدى الفيرويدات فى الكالوس يكون أسرع خلال الستة إلى ثمانية شهور الأولى. الفيرويدان على درجة عالية من تزاوج القواعد وهما يأخذان التركيب الدئرى والشكل شبه العصوى. الوزن الجزيئى للأول ١,٨ × ١٠^٥ دالتون والوزن الجزيئى للثانى ١,٧ × ١٠^٥ دالتون، وهما أكثر ثباتاً للحرارة من كثير من الفيرويدات الأخرى. لم يحدث أن عزل الفيرويدين معاً من نبات واحد مصاب.

بهذا نختم كتابنا بالحمد لله رب العالمين

«وآخر دعواهم أن الحمد لله رب العالمين»

المراجع

كتب

١ ـ فتحى محمد عبدالتواب. البيولوجيا الجزيئية (مدخل الهندسة الوراثية). ١٩٩٣. المكتبة الأكاديمية القاهرة. ٤١٥ صفحة.

٢ ـ فوزى طه قطب. النباتات الطبية ـ ١٩٧٩ ـ الدار العربية للكتاب ـ ليبيا ـ تونس ـ ٣٥٧ صفحة.

3 - Abraham, M., B. Harrow. 1971. Biochemistry. Tenth edition. W. B. Saunders Company. London. 727. pp.

4 - Agrios, G. N. 1988. .Plant Pathology. 3rd edition. Academic press INC. New York. 800 pp.

5 - Buczacki, S. T. and Harris, K. M. 1982. Pests, Diseases and Disorders of garden plants. Collins St. James place London 512 pp.

6 - Francik, R. I. B. *et al.* 1991. Classification and Nomenclature of viruses. Fifth Report of The International Committe on Taxonomy of Viruses. Springer - Verlay Wien. New York. 450 pp.

7 - Mandahar. C. L. 1978. Introduction to plant viruses. S. Chand and Company LTD. New Delhi. pp. 333.

8 - Maramorocch, K. 1991. Viroids and satellites Molecular Parasites at the Frontier of life. CRC Pres, INC. p. 21 - 58.

9 - Roberto, C. 1984. Medical Plants. Macdoland Press London. pp 447. In the English translation. Arnoldo Mondadori Editore S. P. A., Milan.

10 - Smith, K. M. 1979. Plant Viruses. Sixth edition. John Wiley Sons. New York 241 pp.

11 - Walter, R., E. C. Calavand and G. E. Corman. 1978. Citrus industry volum IV. University of Califorina pp. 365.

ملاحظات : ـ

١ ـ الأبحاث والمجلات المذكورة هنا مرتبة حسب سنوات البحث.

٢ ـ هناك مراجع خاصة ومحددة فى نهاية كل فصل من الكتاب فى الجزء الأول.

أبحاث ومجلات

أبحاث سنة ١٩٩٤

1 - Andrew, G. R. and R. H. Symons. 1994. Infectivity of Linear Monomeric Transcripts of Citrus Exocortis viroid. *Virology* 203: 328 - 335.

2 - Chela - Flores, J. 1994. Are viroids molecular fossils of te RNA world? I. *Theoretical Biology* 166 (2) 163 - 166.

3 - Domingo, C., V. Conejero and P. Vera. 1994. Genes encoding acidic and basic Class III B-1,3 glucanases are expressed in tomato plants upon viroid infection. *Plant Molecular Biology* 24 (5): 725 - 732.

4 - Lima, M. I, *et al.* 1994. Dection of avocado Sunblotch viroid in chloroplasts of avocado leaves by in situ hybridization. *Virology* 138: 385 - 390.

5 - Maria, E. N., L. H. Marcellino, E. W. Kitajima. 1994. Nucleotide sequence of the original Brazilian isolate of coleus yellow viroid. *J. General Virol.* 75, 1447 - 1449.

6 - Semancik, J. S. and J. A. Szychowski. 1994. Avocado sunblotch disease. *J. General Virology* 75 (7) 1543 - 1549.

7 - ——— ———, ——— ———, Rakowski, A. C., and R. H. Symons. 1994. A stable 463 nucleotide variant of citrus exocortis viroid produced by terminal repeats. *J. General Virology* 75 (727 - 732).

8 - Takahashi, T., S. Shimakoshi *et al.* 1994. Cytopathology of resin glands from hop plants infected with hop stunt viroid. *zeitschrift f. Pflanzenschutz* 100 (5) 508 - 515.

9 - Tornero, P., V. Conejero and P. Vera. 1994. A gene encoding a novel isoform of the PR-1 protein family from tomato is induced upon viroid infection. *Molecular and GeneralGenetics* 243 (1) 47 - 53.

10 - Wassenegger, M. *et al.* 1994. RNA - directed de novo methylation and genomic sequences in plants. *Cell* (Cambridge) 76 (3) 567 - 576.

أبحاث سنة ١٩٩٣

11 - Fonseca, M. E., V. L. Marinho and T. Nagata. 1993. Hop latent viroid in hop Germ Plasm Introduction into Brazil from U. S. A. *Plant Dis.* 77 : 952.

12 - ——— , ——— and E. W. Kitajima. 1993. French Marigold. A New Experimental Host of Citrus Excocortls Virotd. *Plant Dis.* 77 : 953.

13 - He, X. Y., G. H. Zhou and A. S. Liu. 1993. Identification of strains of potato spindle tuber viroid. *Acta Phytopathological Sinica* 23 (4): 361 - 365.

14 - Ito, T. *et al.* 1993. Detection of a viroid associated with apple fruit crinke disease. *Annals Phytopatl Society Japan.* 59: 520 - 527.

15 - Lakshman, D. K. and S. M. Tavantzis. 1993. Primary and secondary structure of a 360 - nucleotide isolate of potato spindle tuber viroid. *ARCh Virol.* 128 (3 - 4): 319 - 331.

16 - Marcos, J. F. and R. Flores. 1993. Self - cleavage reaction of avocado sunblotch viroid RNAs is present in naturally occurring linear viroid molecules. *J. GEN. VIROL.* 74 (5): 907 - 910.

17 - Matousek, J., Rakousky S. 1993. Antisense DNA inhibits infections

of potato spindle tuber viroid. *Folia Biologica* 39 (2): 87 - 99.

18 - Matousek, J. *et al.* 1993. Inhibition of potato spindle tuber viroid infection with DNA oligonucleotides. *Biochimie* 75 (1 - 2) 63 - 69.

19 - Morton, A., D. J. Barbara and A. N. Adams. 1993. The distribution of hop latent viroid within plant of *Humulum lupulus. Annals of Applied Biology* 123 (1): 47 - 53.

20 - Ou, F. C. *et al.* 1993. Multiple pathways of reversion in viroids for conservation of structural elements. *EMBO J.* 12 (5): 2129 - 2139.

21 - Podleckis, E. V. *et al.* 1993. Chemiluminescent detection of potato and poma fruit viroids. *J. Virol Methods* 43 (2): 147 - 158.

22 - Rigden, J. E. and M. A. Rezaian. 1993. Analysis of sequence variation in grapevine yellow speckle viroid 1 reveals two distinct alternative structures for the pathogenic domain. *Virology* 193 (1) 474 - 477.

23 - Rodriguez, M. J. B., J. W. Randles. 1993. Coconut cadang-cadang viroid mutants associated with severe disease vary in both the pathogenicity and the central conserved region. *Nucleic Acids Research* 21 (11) : 2771.

24 - Rodrigo, I. *et al.* 1993. cDNA cloning of viroid-induced tomato pathogenesis-related protein P. 23. *Plant Physiology* 102 (3) : 939 - 945.

25 - Semancik, J. S. *et al.* 1993. Isolation of citrus exocortis viroid recoverd by host and tissue selection. *J. General Virology* 74 (11) : 2427 - 2436.

26 - Sing, R. P., A. Boucher and T. H. Somervjlle. 1993. Interaction between a mild and a severe strain of potato spindle tuber viroid. *AM. Potato J.* 70 : 85 - 92.

27 - Skrzeczkowski, L. J., W. E. Howell and G. I. Mink. 1993. Correlation between leaf epinasty symptoms on two apple cultivars and results of cRNA hybridization for detection of apple scar skin viroid. *Plant Disease* 77 - (9) - : 919 - 921.

28 - Stocker, S., M. C. Guitton and H. P. Muhlbach. 1993. Phytosynthetically active suspension cultures of potato spindle tuber viroid infected tomato cells as tools for studying viroid host cell interaction. *Plant Cell Reports.* 12 (11) : 597 - 602.

أبحاث سنة ١٩٩٢

29 - Adams, A. N. *et al.* 1992. The distribution and spread of hop latent viroid within two commerical plantings of hop. *Ann Appl Biol.* 121 (3) 585 - 592.

30 - Ashulin, L., M. Mawassi and M. BAR-Joseph. 1992. procedure to amplify cDNA from viroid RNA templates using the polymerase chain reaction. *Methods Mal Cell Biol.* 3 (2) : 83 - 89.

31 - Giunchedi, L. *et al.* 1992. Symptoms of latent mosaic on peach in Emilia - Romagna. *Informatore Fitopatologico* 42 (3) : 47 - 49.

32 - Hadas, R., L. Ashulin and M. BAR - Joseph. 1992. Transmission of a citrus viroid to avocado by heterologous grafting. *Plant Disease* 76 (4) : 357.

33 - Hataya, T., *et al.* 1992. Detection of hop latent viroid using reuerse transcription and polymerase chain reaction. *Ann Phyto-path. Soc.* JPN 58 (5): 677 - 684.

34 - He, X. Y., *et al* 1992. detection of potato spindle tuber viroid by polymerase chain reaction. *Virol Sin* 7 (3): 362 - 366.

35 - Herold, T. *et al.* 1992. Sequence analysis of five new field isolates demonstrates that the chain length of potato spindle tuber viroid is not strictly conserved but as variable as in other viroids. *Plant Mol Biol* 19 (2): 329 - 333.

36 - Hernandez, C. *et al.* 1992. Pear blister canker viroid is a member of the apple scar skin subgroup and also has sequence homology with viroids from other Subgroups. *J. Gen Virol.* 73 (10): 2503 - 2507.

37 - ———— , ———and R. Flores. 1992. plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave *in vitro* via hammerhead structure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89 (9): 3711 - 3715.

38 - Kryczynski, S., A. Stawiszynska, S. Skrzeczkowska. 1992. Pollen transmission of potato spindle tuber viroid to pollinated potato plants. *Horticulture* 16: 59 - 64.

39 - Kyriakou, A. P. 1992. Incidence of Cyprus of citrus exocortis viroid and its mechanical transmission. *Plant Pathol* (OXF) 41 (1): 20 - 24.

40 - Marcos, J. F. and R. Flores. 1992. Characterization of RNAs specific to avocado sunblotch viroid synthesized *in vitro* by a cell-free system from infected avocado leaves. *Virology* 186: 481 - 488.

41 - Meldrals, Ya. A. *et al* 1992. Detection of potato spindle tuber viroid and chrysanthemum stunt viroid using biotinylated oligodeoxyribonucleotide. *Mol Biol* (Mosco) 26 (3): 540 - 545.

42 - Owens, R. A. *et al.* 1992. A new mild strain of potato spindle tuber viroid isolated from wild *Solanum* spp. in India. *Plant Disease* 76 (5): 527 - 529.

43 - Randles, J. W. and D. Hanold. 1992. Indexing of coconut germplasm for viroid and virus. *IBPGR* 44 - 45 *ISBN* 92 - 9043 - 217 - 9.

44 - Rezaian, M. R., L. R. Krake and D. A. Golino. 1992. Common identity of grapevine viroids from USA and Australia revealed by PCR analysis. *Intervirology* 34 (1) : 38 - 43.

45 - Rigden, J. E. and M. R. Rezaian. 1992. *In Vitro* Synthesis of an infectious viroids: Analysis of the infectivity of monomeric linear *CEV. Virology*. 186 (1): 201 - 206.

46 - Sano, T. *et al.* 1992. Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci.* USA. 89 (21) 10104 - 10108.

47 - Schindler, I. M. and H. P. Muehlbach. 1992. Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: A reevaluation. *Plant Sci* 84 (2): 221 - 229.

48 - Semancik, J. S. and J. A. Szychowski. 1992. Relationships amony the viroids from grapevine. *J. Gen Virol.* 73 (6) 1465 - 1469.

49 - ———— , ——— D. J. Gumpf and J. A. Bash. 1992. Interference between viroids inducing excocortis and cachexia diseases of citrus. *Ann. Appl Biol.* 121 (3): 577 - 583.

50 - Singh, R. P. *et al.* 1992. Potato spindle tuber viroid is not encapsidated *in vivo* by potato virus Y particles. *Can J. Plan Patho.* 14 (1) : 18 - 21.

51 - Singh, R. P., A. Boucher and T. H. Somerville. 1992. Detection of potato spindle tuber viroid in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid - infected pollen. *Plant Disease* 76 (9) 951 - 953.

52 - Singh. R. P. *et al.* 1992. A viroid from *Nematanthus wettseinii* plants closely related to the *Columnea latent* viroid. *J. Gen Virol.* 73 (11) : 2769 - 2774.

53 - Steger, G. *et al.* 1992. Structural requirements for viroid processing by RNase. T.1. *J. Mol Biol.* 227 (3) 719 - 739.

54 - Takahashi, T. *et al.* 1992. Growth characteristics in cultured cucumber tissues infected with hop stunt viroid. *J. Phytopath* 136 (4): 288 - 296.

55 - Takahashi, T. et al. 1992. Comparison of plant hormon requirments in leaf tissues from hop stunt virold-infected and uninfected hop plants. *Z. P. PFLANZEN SCHUTZ* 99 (1): 62 - 70.

56 - Welinicki, M. and C. Hiruki. 1992. Highly sensitive digoxigenin - labelled DNA probe for the detection of potato spindle tuber viroid. *J. Virol Method* 39 (1-2): 91 - 99.

57 - Yang, X., A. Hadidi and S. M. Garnsey. 1992. Enzymatic cDNA amplification of citrus excocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. *Phytopathology.* 83 (3): 279 - 285.

أبحاث سنة ١٩٩١

58 - Ashulin, L. *et al* 1991. Nucleotide sequence of a new viroid species, citrus bent leaf viroid isolated from grapefruit in Isreal. *Nucleic Acid Res.* 19 (17): 4767.

59 - Belles, J. M., J. Carbonell and V. Conejero. 1991. polyamines in plants infected by citrus exocortis viroid or treated with silver ions and ethephon. *Plant Physioloby* 96 (4): 1053 - 1059.

60 - Bianco, P. A. and G. A. Vegetti. 1991. Detection and identification of chrysanthemum stunt viroid in Italiy. *Riv Patol Veg* 1 (2-3): 43 - 50.

61 - Elena, S. F. *et al* 1991. Phylogeny of viroids, viroid - like satellite RNAs and the viroid-like blister canker disease. *PROC Natl Acad Sci USA* 88 (13): 5631 - 5634.

62 - Flores, R. *et al.* 1991. Identification of a new viroid as the putative caused agent of pear blister canker disease. *J. Gen Virol.* 72 (6): 1199 - 1204.

63 - Gillings, M. R., P. Broadbent and B. I. Gollnow. 1991. Viroids in Australian Citrus: Relationship to excocortis, cachexia and citrus dwarfing. *Aust J. Plant Physiol* 18 (5): 559 - 570.

64 - Hadidi, A., A. J. Hansen, C. L. Parish and X. Yanc. 1991. Scar skin and dapple apple viroids are seed-borne and persistent in infected apple trees. *Res Virol* 142 (4): 289 - 296.

65 - Hanold, D. and J. W. Randles. 1991. Detection of coconut cadang - cadang viroid - like sequences in oil and coconut palm and other monocotyledons in the South - west Pacific. *Ann. Appl. Biol.* 118 (1): 139 - 152.

66 - Harty, A. 1991. Exocortis viroid in New Zealand. *Orchardist of New Zealnd* 64 (9) 38 - 39.

67 - Hopp, H. E. *et al.* 1991. Development and application of a nonradioactive nucleic acid hybridization system for simultaneous detection of four potato pathogens. *J. Virol Method* 31 (1): 11 - 30.

68 - Kanematsu, S. *et al.* 1991. Comparison of nonradioactive cDNR probes for detection of potato spindle tuber viroid by dot-blot hybridization assay. *J. Virol Methods* 35 (2): 189 - 199.

69 - Kryczynski, S., A. Stawiszynska and S. Skazeczkowska. 1991. Detection of potato spindle tuber viroid in composite plant samples. *Phytopathologica - Polonica* 12 : 29 - 32.

70 - Loss, P. M., *et al.* 1991. formation of thermodynamically metastable structure containing hairpin II is critical for infectivity of potato Spindle tuber RNA. *EMBO J.* 10 (3): 719 - 728.

71 - Matousek, J. *et al.* 1991. An immunochemical testing of pathophysiological reactions of several PSTVd infect tomato. *Biol Plant* 33 (5): 358 - 365.

72 - ————, *et al.* 1991. Instable expression of potato spindle tuber viroid complementary DNA trasformed potato. *Arch Phyto., Z.* 27 (3) 167 - 173.

73 - Meldrais, Ya. A., I. E. Line and T. I. Gurinovich. 1991. Chrysanthemum stunt viroid cDNA cloning into plasmid pUC19 and the cloned cDNA for detection of chrysanthemum stunt viroid. *Mol Biol.* (Mosco) 25 (5): 1301 - 1307.

74 - Mishra, M. D. *et al.* 1991. Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of citrus excocortis viroid. *J. Gen Virol.* 72 - (8): 1781 - 1786.

75 - Singh, R. P. *et al.* 1991. Differential migration during polyacrylamide gel electropheresis suggests conformational differences among strains of potato spindle tuber viroid. *Can. J. Plant Pathol.* 13 - (3) 202 - 211.

76 - Singh, R. P., A. Boucher and R. G. Wang. 1991. Detection, distribution and longterm persistence of potato spindle tuber viroid in true potato seed from Chaina. *Potato J.* 68 (1) : 65 - 74.

77 - ______ , ______, and A. singh. 1991. High incidence of transmission and occurrence of a viroid in commercial seeds of *Coleus* in Canada. *Plant Disease* 75 (2): 184 - 187.

78 - Trnena, L. and J. Matousek. 1991. Aminopeptidase activity in potato spindle tuber viroid infected tomato leaves. *Phytopathol PF lanzenschutz* 27 (2): 117 - 125.

79 - Tsagris, M., M. Tabler and H. L. Saenger. 1991. RNase T_1 generates circular RNA molecules from viroid-specific RNA transcripts by cleavage and intramolecular ligations. *Nucleic Acid Res.* 19 (7): 1605 - 1612.

80 - Ziegler, A., E. Reiss and J. Schubert. 1991. Detection of potato spindle tuber viroid with nonradioactive hybridization probes. *Arch phytopath. Z.* 27 (5): 411 - 414.

أبحاث سنة ١٩٩٠

81 - Barbara, D. J. et al. 1990. Some effects of hop latent viroid on two cultivars of hop in the UK. *Ann. Appl Biol.* 117 (2): 359 - 360.

82 - Barbara, D. J., A. Morton and A. N. Adams. 1990. Assessment of UK hops for the accurrence of hop latent and hop stunt viroids. *Ann. Appl. Biol.* 116 (2): 265 - 272.

83 - Belles, Joes M., A. Granell and V. Conejero. 1990. Impairment of virod infection in *G. aurantiaca* plants by treatment with ethephon. *Can J. Plant Pathol* 12 (2): 175 - 179.

84 - Candresse, T., T. O. Diener and R. A. Owens. 1990. The role of the

viroid central conserved region in complementary DNA infectivity. *Virology* 175 (1): 232 - 237.

85 - Duran-Vila, N. and J. S. Semancik. 1990. Variations in the crossprotection effect between two strains of citrus exocortis viroid. *Ann. Appl. Biol.* 117 (2): 367 - 378.

86 - Dusi, A. N., M. E. N. Fonseca and A. C. Deavila. 1990. Occurrence of a viroid in chrysanthemum in Brazil. *Plant Pothol* (OXF) 39 (4): 636 - 637.

87 - Flores, R. *et al.* 1990. Some properties of the viroid inducing peach latent mosaic disease. *Res Virol* 141 (1): 109 - 118.

88 - Hu, K., Z. Yong-Zhi and d. DA-Ming. 1990. Effect of some chemicals on infectivity and replication of citrus exocortis viroid. *Virol sin* 5 (4): 410 - 418.

89 - Hadidi, A. *et al.* 1990. Homology of the agent associated with dapple apple diseases to apple scar skrin viroid and molecular detection of these viroids. *Phytopathol.* 80 (3): 263 - 268.

90 - ——, ——and X. Yang. 1990. Detection of pome Fruit viroids by enzymatic complementary DNA amplification. *J. virol. Methods* 30 (3): 261 - 270.

91 - Juarez, J. *et al.* 1990. Separation of citrus viroids by shoot - tip grafting *in vitro. Plant Pathol.* (OXF). 39 (3): 472 - 476.

92 - Jiang, L., C. Wel, T. Poand and L. Yi. 1990. Temperature - gradient gel electrophoresis of apple scar skin viroid. *Acta Microbiol Sin* 30 (4): 278 - 283.

93 - Marcos, J. F. and R. Flores. 1990. Subcellular location of avocado viroid in avocado teaves. *Plant Sci* 67 (2): 237 - 244.

94 - Owens, R. A. 1990. Mutational analysis of viroid pathogenicity: To-

mato apical stunt viroid. *Mol Plant Microbe Interact* 3 (6): 374 - 380.

95 - Owens, R. A., T. Candresse and T. O. Diener. 1990. construction of novel viroid chimeras containing proteins of tomato apical stunt and citrus exocortis viroids. *Virology* 175 (1) 238 - 246.

96 - Rezaian M. A. 1990. Australian grapevine viroid evidence for extensive recombination between viroids. *Nucleic Acids Res* 18 (7): 1813 - 1818.

97 - singh, R. P., A. Boucher and T. H. Somerville. 1990. Cross - protection with strains of potato spindle tuber viroid in the potato plant and other solanaceous hosts. *Phytopath.* 80 (3) 246 - 250.

98 - —— , —— and G. C. C. Tai. 1990. High levels of viroid in tomato and potato plants inoculated with minimal amounts of potato spindle tuber viroid. *Can J. Plant Pathol* 12 (1): 11 - 15.

99 - Vera, P. and V. Conejero. 1990. Citrus exocortis viroid infection atlters the *in vitro* pattern of protein phosphorylation of tomato proteins. *Mol Plant-Microbe Interact* 3 (1): 28 - 32.

100 - Welnicki, M. *et al* 1990. Detection of potato spindle tuber viroid by molecular hybridization and bioassay. A large - scale comparison. *Potato Research* 33 (4) 497 - 503.

101 - Yokoyama, M. *et al.* 1990. Detection of specific RNA by in situ hybridization in plant protoplasts. *Plant Cell Physi.* 31 (3): 403 - 406.

102 - Zekanowski, C. *et al.* 1990. Detection of PSTVd in dormant potato tubers by concatameric complementary DNA probe. *J. Virol. Methods.* 30 (1): 127 - 130.

أبحاث سنة ١٩٨٩

103 - Flores, R. 1989. Synthesis of RNA specific to citrus exocortis viroid. *J. Gen Virol.* 70 (10): 2695 - 2706.

104 - Fonseca, M. E. *et al.* 1989. A small viroid in *Coleus* sp. from Brazil. *Fitopathol Bras* 14 (1): 94 - 96.

105 - Galindo, J., C. Lopez and T. Aguilar. 1989. Discovery of the transmitting agent of tomato planta macho viroid. *Rev Mex Fitopatol* 7 (1) 61 - 65.

106 - Hammond, R. W., T. O. Diener and R. A. Owens. 1989. Infectivity of chimeric viroid transcripts reveals the presence of alternative processing sites in potato spindle tuber viroid. *Virology* 170 (2) 486 - 495.

107 - ——— , ——— , ——— and d. R. Smith. 1989. Nucleotide sequence and proposed secondary structure of *Columnea* latent viroid. *Nucleic acids Res.* 17 (23): 10083 - 10094.

108 - Harders, J. *et al.* 1989. Imaging of viroids in uuclei from tomato leaf tissue by in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *EMBO J.* 8 (13): 3941 - 3950.

109 - Jaswal, M. S. 1989. Reuse of buffers in return polyacrylamide gel electrophoresis tests for the detection of potato spindle tuber viroid. *AM. Potato J.* 66 (12): 813 - 820.

110 - Kondakova, O. A. *et al.* 1989. Potato spindle tuber viroid does ot complement TMV temperature-sensitive transport function. J. GEN Virol. 70 (6): 1609 - 1612.

111 - Koltunow, A. M. *et al.* 1989. Two related viroids cause grapevine yellow speckle disease independently. *J. GEN. Virol.* 70 (12): 3411 - 3420.

112 - ———, ———,and M. A. Rezaian. 1989. Grapevine viroid 1B, A new member of the apple scar skin viroid group contains the left terminal region of tomato planta macho viroid. *Virology* 170 92): 575 - 578.

113 - ——— , ———, and ———. 1989. A scheme for viroid classification. *Intervirology* 30 (4): 194 - 201.

114 - Leitao, T., Duran-Vila, N. 1989. Detection of viroid RNAs in grapevine varieties from Portugal. *Mol. Cellular Bio* 14 (1-2) 29 - 39.

115 - Ma, X. *et al.* 1989. A small circular RNA from citrus plant. *Chin J. Virol* 5 (2) 140 - 144.

116 - Mcinnes, J. L., N. Habili and R. H. Symons. 1989. Nonradioactive, photobiotin-labelled DNA probes for routine diagnosis of viroids in plant extracts. *J. Virol Methads* 23 (3): 299 - 312.

117 - Meldrais, Ya. A. *et al.* 1989. The use of synthetic oligodeoxyribonucleotide probe for the diagnosis of viroid diseases in potato and chrysanthemum. *Mol Biol* (Mosco) 23 : 816 - 821.

118 - Mozhaeva, K. A. *et al.* 1989. A comparative study of various diagnostic method of potato spindle shaped tuber viroid. *Biol Nauki* (Mosco) 0 (7): 104 - 110.

119 - Pallas, V. and R. Flores. 1989. Interactions between citrus exocortis and potato tuber spindle viroids in plants of *Gynura aurantiaca* and *Lycopersicon esculentum. Intervirology* 30 (1): 10 - 17.

120 - Puchta, H. and H. L. Saenger. 1989. Sequence analysis of minute amounts of viroid RNA using the polymerase chain reac

tion. *Arch Virol.* 106 (3) 335 - 340.

121 - Rakowski, A. G. and R. H. Symons. 1989. Comparative sequence studies of variants of avocado sunblotch viroid. *Virology.* 173 (1): 352 - 356.

122 - Rivera - Bustamante, R. F. and J. S. Semancik. 1989. Properties of a viroid - replicating complex solubilized from nuclei. *J. Gen. Virol.* 70 (10) 2707 - 2716.

123 - Roy, B. P., M. G. Abuhaidar and A. Alexander. 1989. Biotinylated RNA probes for the detection of potato spindle tuber viroid. *J. Virol. Methods.* 23 (2): 149 - 156.

124 - Sano, T. *et al.* 1989. Hop Stunt Viroid strains from dapple fruit disease of plum and peach in Japan. *J. Gen Virol.* 70 (6): 1311 - 1320.

125 - Schroeder, M. and H. L. Weidemann. 1989. Simplified application of return gel electrophoresis for te routine detection of potato spindle tuber viroid. *Bull Oepp.* 19 (4) 661 - 666.

126 - Singh, R. P. *et al.* 1989. Characteristics of cross-protection with potato spindle tuber viroid strains in tomato plants. *Can. J. Plant Pathol* 11 (3) 263 - 267.

127 - Tanimura, H. *et al.* 1989. chemical synthesis of the 24 RNA fragments corresponding to hop stunt viroid. *Nucleic Acids Res.* 17 (20): 8135 - 8148.

128 - Vera, P. and V. Conejero. 1989. The induction and accumulation of the pathogenesis-related P 69 proteinase in tomato during citrus exocortis viroid infection and in response to chemical treatments. *Physiol. Mol. Plant Pathol* 34 (4): 323 - 334.

129 - Vera, R., J. H. Yago and V. Conejero. 1989. Immunogold localiza-

tion of the citrus exocortis viroid-induced pathogenesis - related proteinase P 69 in tomato leaves. *Bethesda* 91 (1): 119 - 123.

130 - Yang, G., D. Daming and Z. Yongzhi. 1989. Infection of *Gynura aurantiaca* leaf protoplasts with citrus exocortis viroid. *Chin J. Virol.* 5 (3): 277 - 279.

131 - Yang, G., Z. Y. Chen and D. Daming. 1989. Two kinds of cirular RNA in *G. aurantiaca* cell infected with citrus exocortis viroid. *China J. Virol* 5 (11): 364 - 369.

132 - Yamaya, J. *et al.* 1989. Expression of hop stunt viroid from its complementary DNA in transgenic tobacco plants. *Mol Plant - Microbe Interact* 2 (4): 169 - 174.

133 - Zhang, H. et al. 1989. Detection of potato spindle tuber viroid with biotin-labelled PSTVd complementary DNA probe. *China J. Virol.* 5 (1): 72 - 76.

أبحاث سنة ١٩٨٨

134 - Branch, A. D. *et al.* 1988. Interference between coinoculated viroids. *Virology* 163 (2): 538 - 546.

135 - Branch, A. D., B. J. Benenfield and H. D. Robertson. 1988. Evidence for single rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci* USA. 85 (23): 9128 - 9132.

136 - Candresse, T. *et al.* 1988. Detection of chrysanthemum stunt viroid using nick translated probes in a dot-blot hybridization assay. *J. Virol. Methods* 20 (3): 185 - 195.

137 - Chen, W., L. Lei, T. Po, P. Vos and R. Goldbach. 1988. Molecular cloning of complementary DNA of chrysanthemum stunt

viroid. *Chin J. Virol* 4 (2): 173 - 175.

138 - Chen, W. *et al.* 1988. Grafting external healthy pear bud induces scar skin viroid in apple. *Chin J. Virol.* 4 (4): 367 - 370.

139 - Diener, T. O., D. R. Smith and M. Davino. 1988. Citrus B viroid identified as strain of hop stunt viroid. *Plant Dis.* 72 (8) 691 - 693.

140 - Duran - Vila, N. *et al.* 1988. A definition of citrus viroid groups and their relationship to the excocortis disease. *J. Gen Virol.* 69: 3069 - 3080.

141 - ——, ——1988. Production of viroid - free grapevines by Shoot tip culture. *Am. J. Vitic* 39 (3): 217 - 220.

142 - Keese, P., M. E. Osorio - Keese and R. H. Symons. 1988. Coconut tinangaja viroid: Sequence homology with coconut cadang - cadang viroid and other PSTVd related RNAs. *Virology* 162 (2): 508 - 510.

143 - Khoury, J. *et al.* 1988. Concentration and distribution of mild and severe strains of PSTV in cross-protection tomato plants. *Phytopathology.* 78 (10): 1331 - 1336.

144 - Koltunow, A. M. and M. A. Rezaian. 1988. Grapevine yellow speckle viroid. Structural features of a new viroid group. *Nucleic Acids Res.* 16 (3) 849 - 864.

145 - —— , —— , ——and L. R. Krake. 1988. Hop stunt viroid and Australlian grapevine cultivars. *Australans plant Pathol.* 17 (1): 7 - 10.

146 - Kryczynski, S. *et al.* 1988. Transmission of three viroids throug seed and pollen of tomato plants. *J. Phytopath.* (BERL) 121 (1): 51 - 57.

147 - Ma, X. X. X. *et al.* 1988. An effective procedure for the separation

and preparation of citrus exocortis viroid. *Virolsin* 3 (4): 370 - 375.

148 - Ohshima, K. *et al.* 1988. comparative studies on hostrange and the infectivity of hop stunt viroid cucumber isolate (cucumber pale fruit viroid) native RNA and its complementary DNA. *Arch Phytopathol PFlanzenschutz* 24 (6) 475 - 484.

149 - Puchta, H., K. Rumm and H. L. Saenger. 1988. The molecular structure of hop latent viroid, a new viroid occurring world wide in hops. *Nucleic Acids Res.* 16 (10): 4197 - 4216.

150 - Rezaian, M. A., A. M. Koltunow and L. R. Krake. 1988. Isolation of three viroids and a circular RNA from grapevines. *J. Gen virol.* 69 (2): 413 - 422.

151 - Sano, T. *et al.* 1988. Synthetic oligonucleotide hybridization probes to diagnose hop stunt viroid strains and citrus exocortis viroid. *J. Virol. Methods* 19 (2): 109 - 120.

151 - Semancik, J. S., C. N. Roistacher, R. and N. Duran - Vila. 1988. Citrus Cachexia viroid, a new viroid of citrus. Relationship to viroids of the exocortis disease complex. *J. Gen. Virol.* 69 (12): 3059 - 3068.

152 - Singh, R. P. and A. Boucher. 1988. Loss of potato spindle tuber viroid from tuber tissues after repeated freezing. *AM. Potato J.* 65 (5): 283 - 288.

153 - ——,and ——and J. E. Seabrook. 1988. Detection of the mild strains of potato spindle tuber viroid from single true potato seed by return electrophoresis. *Phytopathol.*, 78 (6): 663 - 667.

154 - Xiong, C. *et al.* 1988. Growth properties of CEVd-infected *Gynura aurantiaca* cell suspension system. *Acta Micro Biol Sin* 28 (4): 361 - 366.

155 - Zhang, QI - YA, Z. GE and DA-Ming. Ding. 1988. Distribution of citrus exocortis viroid in different organs of *Gynura aurantiaca. Virol Sin* 3 (1): 71 - 76.

156 - ——, ——, ——1988. Could CEVd be removed by root propagation. *Chin J. Virol.* 4 (3): 275 - 276.

أبحاث سنة ١٩٨٧

157 - Bernardy, M. G., G. G. Jacoli and H. W. J. Ragetli. 1987. Rapid detection of potato spindle tuber viroid by dot blot-hybridization. *J. Phytopath* (BERL) 118 (2): 171 - 180.

158 - Bitters, W. P., N. Duran - Vila and J. S. Semancik. 1987. Effect of citrus exocortis viroid on flower and fruit structure and development on Etrog citron. Plant Disease 71 (5): 397 - 399.

159 - Granell, A., J. M. Belles and V. Conejero. 1987. Induction of pathogenesis - related protein in tomato by citrus exocortis viroid, silver ion and ethephon. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 31 (4): 83 - 90.

160 - Grasmick, M. E. and S. A. Slack. 1987. Detection of potato spindle tuber viroid in true potato seed by bioassay on Rutgers tomato. *AM. Potato J.* 64 (5): 236 - 244.

161 - Kryczynski, S. and E. Paduch - Cichal. 1987. A comparative study of four viroids. *J. Phytopathol.* (BERL) 120 (2): 121 - 129.

162 - Lopez - Herrera, C., F. Pliego and R. Flores. 1987. Detection of avocado Sunblotch viroid in Spain by double polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Phytopathol.* (BERL) 119 (2): 184 - 189.

163 - Morelli, L. T., P. E. Nelson and R. K. Horst. 1987. Histopathology of the Chrysanthemum cultivar Bonni Jean infected with Chrysanthemum Stunt Viroid. *Phytopathology* 77 (5): 655 - 660.

164 - Paduch - Cichal, E. and S. Kryczynski. 1987. A low temperature therapy and meristem - tip culture for eliminating four viroids from infected plants. *J. Phytopathol.* (BERL). 118 (4): 341 - 346.

165 - Pallas, V., A. Navarro and R. Flores. 1987. Isolation of a viroid - like RNA from hop different hop stunt viroid. *J. Gen Virol.* 68 (12) 3201 - 3206.

166 - Palukaitis, P. 1987. Potato spindle tuber viroid: Investigation of the longdistance, intraplant transport route. *Virology.* 158 (1): 239 - 241.

167 - ———,and M. Zaitlin. 1987. The nature and biological significance of linear potato spindle tuber viroid molecules. *Virology* 157 (1): 199 - 210.

168 - Pechan, R., H. Kuvert and H. J. Gross. 1987. Are small RNAs associated with Crohns' disease? Z. *Natur. Sect Bio Sci* 42 (7/8): 1000 - 1008.

169 - Schwinghamer, M. W. and P. Broadbent. 1987. Association of viroids with a graft-transmissible dwarfing symptoms in Australian orange trees. *Phytopath.* 77 (2): 205 - 209.

170 - ——, ——, ——1987. Detection of viroids in dwarfed orange trees by transmission to chrysanthemum. *Phytopathol.* 77 (2): 210 - 215.

171 - Semancik, J. S., R. Rivera - Bustamante and A. C. Goheen. 1987. Widespread occurrence of viroid-like RNA species in grapevines. *AM. J. ENOL VITIC* 38 (1): 35 - 40.

172 - Singh, R. P. and A. Boucher. 1987. Electrophoretic separation of a severe from mild strains of potato spindle tuber viroid. *Phytopathol.* 77 (11): 1588 - 1590.

173 - Tsagris, M., M. Tabler and H. L. Saenger. 1987. Oligomeric potato spindle tuber viroid RNA does not process autocatalytically under conditions where other RNA species do. *Virology* 152 (1): 227 - 231.

174 - Weidemann, H. L. 1987. The distribution of potato spindle tuber viroid in potato plants and tubers. *Bull OEPP* 17 (1): 45 - 50.

175 - Zhou, Y. C. and. D. Daming. 1987. A preliminary study on the cultivation of citrus exocortis viroid in the tissue culture of *Gynura aurantiaca. Chin J. Virol* 3 (3): 277 - 281.

أبحاث سنة ١٩٨٦

176 - Belles, J. M. *et al.* 1986. Antiviroid effects of ribavirin of citrus exocortis viroid infection in *Gynure aurantiaca. Physiol Mol Plant Pathol* 28 (1): 61 - 66.

177 - Conejero, V. and A. Granell. 1986. Stimulation of a viroid - like syndrome and the impairment of viroid infection *Gynura aurantiaca* plants by treatment with silver ions. *Physiol. Mol. Plant* Pathol. 29 (3): 317 - 324.

178 - Diener, T. O. 1986. Viroid processing: A model involving the central conserved region and hairpin I. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 (1): 58 - 62.

179 - Dinter, G. G. 1986. Viroids and virusoids are related to group I introns. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 (17) 6250 - 6254.

180 - Duran - Vila, N., R. Flores and J. S. Semancik. 1986. Characteriza-

tion of viroid - like RNA associated with the citrus exocortis Syndrome. *Virology* 150 (1): 75 - 84.

181 - Flores, R. 1986. Detection of citrus exocortis viroid in crude extracts by dot-blot hybridization. *J. Virol Methods* 13 (2): 161 - 170.

182 - Grasmick, M. E. and S. A. Slack. 1986. Effect of potato spindle tuber viroid on sexual reproduction and viroid transmission in the true potato seed. *Can. J. Bot.* 64 (2) 336 - 340.

183 - Orozco, V. G. and J. G. Alonso. 1986. Ecology of tomato plant macho viroid. *Rev. Mex Fitopathol* 4 (1): 19 - 28.

183 - Rivera - Bustamante, R. F., R. Gin and J. S. Semancik. 1986. Enhanced resolution of circular and linear molecular forms of viroid and viroid - like RNA by electrophoresis in a discontinuous pH system. *Annl Biochem* 156 (1): 91 - 95.

184 - Schumacher, J., *et al.* 1986. Diagnostic procedure for detection of viroid and viruses with circular DNA by return - gel electrophoresis. *J. Phytopathol.* (Berl) 115 (4): 332 - 343.

185 - Sano, T. *et al.* 1986. A viroid resembling hop stunt viroid in grapevines from Europe, the USA and Japan. *J. Gen Virol* 67 (8): 1673 - 1678.

186 - Schwinghamer, M. W. and G. R. Scott. 1986. Survey of New South Wales potato crops for PSTVd. *Plant Dis.* 70 (8) 774 - 776.

187 - Semancik, J. S. 1986. Separation of viroid RNA by cellulose chromatography indicating conformational distinctions. *Virol.* 155 91): 39 - 45.

188 - Singh, R. P., D. Levesque and R. R. King. 1986. A rapid procedure for the purification of PSTV. *Can J. Plant Pathol.* 8 (1) 54 - 58.

189 - Visvader, J. E. and R. H. Symon. 1986. Replication of *in vitro* constructed viroid mutants. *Embo J.* 5 (9): 2051 - 2056.

190 - Wang, M. C. et al. 1986. Alternation in cell wall composition and structure in viroid - infected cells. *Physiol Mol. Plant Pathol.* 28 (1): 107 - 124.

191 - Yoshikawa, N. and T. Takahashi. 1986. Inhibition of hop stunt viroid replication by α-amanitin. *Z. Pflanzenkr Pflanze Nschutz* 93 (1): 62 - 71.

192 - Zhang, Q. Y. *et al.* 1986. Synthesis of CEVd and CSVd and detection by the probes. *Virol Sin* 1 (4): 93 - 98.

أبحاث سنة ١٩٨٥

193 - Bar - Joseph, M., *et al.* 1985. Detection of avocado sunblotch viroid by hybridization with synthetic oligonucleatide probes. *J. Virol Methods* 10 (1) 69 - 74.

194 - Barker, J. M. *et al.* 1985. Dot-blot procedure with phosphorus-32 DNA probes for the sensitive detection of avocado sunblotch and other viroids in plants. *J. Virol Methods* 10 (2): 87 - 98.

195 - Flores, R. *et al.* 1985 - Dection of viroid and viroid - like RNA species from grapevine. *J. Gen Virol.* 66 (10): 2095 - 2102.

196 - Grasmick, M. E. and S. A. Slack. 1985. Symptom expression enhanced and low concontrations of Potato spindle tuber viroid amplified in tomato with high light intensity and temperature، *Plant Dis.*, 69 (1): 49 - 51.

197 - Imperial, J. S., R. M. Bautista and J. W. Randles. 1985. Transmission of the coconut cadang - cadang viroid to six species of palm by inoculation with nucleic acid extracts. *Plant Pathol* (London) 34 (3): 391 - 401.

198 - Kano, T. and A. Yamaguchi. 1985. Indexing for citrus exocortis viroid using herbaceous plants. *Bull Fruit Tree Stn Ser B* 12 (95 - 108).

199 - Keese, P. and R. H. Symons. 1985. Domains in viroids. Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 82 (14): 4582 - 4586.

200 - Koganezawa, H. 1985. Transmission to apple seedlings of a low molecular weight RNA extracted from apple scar skin disease trees. *Ann. Phytopathol. Soc.* JPN. 51 (2): 176 - 182.

201 - Meshi, T. *et al.* 1985. The sequence necessary for the infectivity of hop stunt viroid complementary DNA clones. *Mol Gen Genet.* 200 (2): 199 - 206.

202 - Mohamed, N. A. *et al.* 1985. Purification and infectivity of the coconut cadang - cadang viroid. *Phytopathology,* 75 (1): 79 - 83.

203 - Sano, T. *et al.* 1985. A viroid - like RNA isolated from grapevine has high sequence homology with hop stunt viroid. *J. Gen Virol* 66 (2): 333 - 338.

204 - Schnoelzer, M. *et al.* 1985. Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid. *EMBO J.* 4 (9): 2181 - 2190.

205 - Singh, R. P. and C. F. Crowley. 1985. Successful management of potato spindle tuber viroid in seed potato crop. *Can. Plant dis Surv* 65 (1): 9 - 10.

206 - Takahashi, T. *et al.* 1985. Some characteristics in cytopathic changes induced by viroid infection. *J. Fac. Agric Iwate Univ.* 17 (3): 267 - 280.

207 - ——, ——and S. Yaguchi. 1985. Strategies for preventing mechanical transmission of hop stunt viroid. Chemical and heat inactivation on contaminated tools. *Z. PFlanzenkr PFlanzenschutz* 92 (2): 132 - 137.

208 - Yoshizaki, T. *et al.* 1985. The effects of some chemical on the infectivity of cucumber isolate of hop stunt viroid. *Ann Phytopathol Soc. JPN* 51 (4): 405 - 412.

209 - Yaguchi, S. and T. Takahashi. 1985. Syndrome characteristics and endogenous IAA levels in cucumber plants incited by hop stunt viroid. *Z. PFlanzenkr P.* 92 (3): 263 - 269.

أبحاث سنة ١٩٨٤

210 - Boiko, A. L., G. S. Litvinov and S. A. Romasher. 1984. Viroid causing stunt deformity of hop plants in biocenoses of the Ukrainian SSR. D. A. N. U. S. S. B. G. K. B. N. 0 (11): 62 - 65.

211 - DA GRACA, J. V. and T. E. Mason. 1984. Detection of avocade sunblotch viroid in flower buds by polyacrylamide gel electrophoresis. *Phytopathol., Z.* 108 (3/4) : 262 - 266.

212 - Flores, R. 1984. Is the conformation of viroids involved in their pathogenicity. *J. Theor Biol* 108 (4): 519 - 528.

213 - Momma, T. and T. Takahashi. 1984. Development morphology of hop stunt - viroid infected hop plants and analysis of their cone yield. *Phytopatho. Z.* 110 91): 1 - 14.

214 - Mohamed, N. R. and J. S. Imperial. 1984. Detection and concentration of coconut cadang - cadang viroid in coconut leaf extracts. *Phytopathology* 74 (2): 164 - 169.

215 - Perez, R. *et al.* 1984. Exocortis viroid presence in clementine Mandarin grafted on Troyer. *Cent Agric* 11 (3): 65 - 72.

216 - Spiegel, S., M. Alper and R. N. Allen. 1984. Evaluation of biochemical methods for the diagnosis of the avocado sunblotch viroid in Israel. *Phytoparasitica* 12 (1): 37 - 44.

217 - Sano, T., I. Uyeda and E. Shikata. 1984. Comparative studies of hop stunt viroid and cucumber pale fruit viroid. *Ann. Phytopathal Soc. JPN* 50 (3): 339 - 345.

218 - Schumacher, J., J. W. Randles and D. Riesner. 1984. A 2 - dimensional electrophoretic technique for the detection of circular viroids and virusoids. *Annl Biochem.* 135 (2) : 288 - 295.

219 - Semancik, J. S. and Judy, Z. 1984. Enhanced detection of viroid - RNA after selective divalent cation fractionation. *Ann. Biochem.*, 135 (2): 275 - 279.

220 - Steger, G. *et al.* 1984. conformational transitions in viroids and virusoids *J. Biomol Struct Dyn* 2 (3): 543 - 572.

221 - Tabler, M. and H. Saenger. 1984. Cloned single - stranded and double - stranded DNA copies of PSTV RNA and co-inoculated subgenomic DNA fragments are infectious. *Eur Mol Biol Organ J.* 3 (13): 3055 - 3062.

222 - Uyeda, I., T. Sano and E. Shikata. 1984. Purification of cucumber pale fruit viroid. *Rnn. Phytopathol. soc. JPN.* 50 : 331 - 338.

223 - Vasileva, T. Y. and K. A. Mozhaeva. 1984. Resistance of PSTVd to certain physical factors. *Biol Nauki* (Mosco) 0 (3): 15 - 21.

224 - Watermeyer, S. R. 1984. Detection of chrysanthemum stunt viroid in South Africa by PAGE and bioassay. *Plant Dis.* 68 (6): 485 - 488.

225 - Yaguchi, S. and T. Takahashi. 1984. Response of cucumber cultivars and other cucurbitaceous species to infection by hop stunt viroid. *Phytopathol. Z.* 109 (1) : 21 - 31.

226 - ——,and ——1984. Survival of hop stunt viroid in the hop garden. Phytopathol. Z. 109 (1) 32 - 44.

أبحاث سنة ١٩٨٣

227 - Deloire, A., P. Mampouga and J. Robert. 1983. Studies of an incompatibility to grafting, produced in 2 species of citrus, with the aid of *in vitro* micrografts due to the presence in the scion of exocortis viroid. *Cr Seances Acad Sci Ser III Sci Vie* 297 (13) 621 - 626.

228 - Kiefr, M. C., R. A. Owens and T. O. Diener. 1983. Structural similarities between viroids and transposable genetic elements. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 80 (20) 6234 - 6238.

229 - Larosa, A. *et al.* 1983. Chrysanthemum stunt viroid in Italy. *Riv. Patho Veg* 19 (2): 77 - 84.

230 - Momma, T. and T. Takahashi. 1983. Cytopathology of shoot apical meristem of hop plants infected with hop stunt viroid. *Phytopathol. Z.* 106 (3) : 272 - 280.

231 - Muehlbach, H., O. Faustmann and H. L. Saenger. 1983. Conditions for optimal growth of PSTVd infected potato cell suspension and detection of viroid - complementary longer - than - unit - length RNA in these cells. *Plant Mol Biol* 2 (5): 239 - 248.

232 - Riesner, D. M. *et al.* 1983. Dynamics and interactions of viroids. J. *Biomol Struct Dyn* 1 (3) 669 - 688.

233 - Rosner, A. S., M. Alper and M. Bar Joseph. 1983. Detection of avocado sunblotch viroid - *Plant Mol. biol* 2 (1): 15 - 18.

234 - Schumacher, J., H. L. Saenger and D. Riesner. 1983. Subcellular localization of viroids in highly purified nucleic acid from tomato leaf tissue. *EMBO J.* 2 (9): 1549 - 1556.

235 - Spiesmacher, E. *et al.* 1983. Oligomeric forms of PSTVd and of its complementary RNA *Bio Sci Rep* 3 (8): 767 - 774.

236 - Takahashi, T., M. Takada and N. Yoshikawa. 1983. Comparative indexing of hop plants for hop stunt viroid infection. *J. Fac. Agri Iwate Univ.* 16 (3): 141 - 150.

أبحاث سنة ١٩٨٢

237 - Branch, A. et al. 1982. Cell-Free circularization of viroid progeny RNA by an RNA ligase from wheat germ. *Science* 217 : 1147 - 1149.

238 - Flores, R. and J. S. Semancik. 1982. Properties of a cell-free system for synthesis of citrus exocortis viroid. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 79 (20): 6285 - 6288.

239 - Galindo, A., J. D. R. Smith and T. O. Diener. 1982. Etiology of Planta Macho aviroid disease of tomato. *Phytopathol.* 72 (1) 49 - 54.

240 - Gross, H. J. *et al.* 1982. Nucleotide sequence and secondary structure of CEVd and CSVd. *Eur J. Biochem.* 121 (2): 249 - 258.

241 - Haseloff, J. *et al.* 1982. Viroid RNA of cadang - cadang disease of coconut. *Nature* (London) 229 (2881). 316 - 321.

242 - Momma, T. and T. Takahashi. 1982. Ultrastructural of hop stunt viroid - infected leaf tissue. *Phytopath. Z.* 104 (3): 211 - 221.

243 - Mohammed A. R. *et al.* 1982. Characterization of the different electrophoretic forms of the cadang - cadang Viroid. *J. Gen. Virol.* 63 (1): 181 - 188.

244 - Mosch, W. H. *et al.* 1982. Development of a standered method for detection of PSTVd in potato plants. *NETH J PLANT PATHOL.* 88 (3): 113 - 122.

245 - Naddi, Z. E. *et al.* 1982. Studies of the viroid of exocortis diseases in citrus plants. *Izv. Timiryazen S-KH AKAD 0* (4): 187 - 189.

246 - Ohno, T. *et al.* 1982. purification and characterization of hop stunt viroid. *Virology.* 118 (1): 54 - 63.

247 - Owens, R. A and T. O. Diener. 1982. RNA intermediates in PSTVd replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 79 (1): 113 - 117.

248 - Rohde, W. 1982. Affinity chromatography of viroid RNA. *Arch Virol* 71 (2): 169 - 176.

249 - Yoshikawa, N. and T. Takahashi. 1982. Purification of hop stunt viroid. *Ann Phytopathol Soc. JPN* 48 (2): 182 - 191.

250 - Zelcer, A. *et al.* 1982. PSTVd infected tissues contain RNA complementary to the entire viroid. *J Gen Virol* 59 (1): 139 - 148.

251 - Zelazny, B. and E. Pacumbaba. 1982. Incidence of cadang - cadang disease of coconut palm in Philippins. *Plant Dis* 66 (7): 547 - 549.

أبحاث سنة ١٩٨١

252 - Boccardo, G. *et al.* 1981. Tinangaja and bristle top coconut disease of uncertain etiology in Guam. *Phytopathology* 71 (10): 1104 - 1107.

253 - DA GRACA, J. V. and M. M. Martin. 1981. Ultrastractural changes in avocado leaf tissue infected with avocado sunblotch viroid. *Phytopathol Z* 102 (3/4): 185 - 194.

254 - Diener, T. O. 1981. Viroids: Minimal biological system: *Biosciences* 31 (1): 38 - 44.

255 - Dickson, E. 1981. A model for the involvement of viroids in RNA splicing. *Virology* 115 (1): 216 - 221.

256 - Klotz, G. and H. L. Saenger. 1981. Electron microscopic evidence for viroid conformers. *Eur J. Cell Biol.* 25 (1): 5 - 7.

257 - Imperial, J. *et al.* 1981. Variation in the viroid - like RNA associated with cadang - cadang disease. *J. Gen Virol.* 56 (1): 77 - 86.

258 - Owens, R. and T. O. Diener. 1981. Sensitive and rapid diagosis of PSTVd disease by nucleic acid hybridization. *Science* (Wash - Dc) 213 (4508) : 670 - 672.

259 - Palukaitis, P. *et al.* 1981. Rapid indexing of the sunblotch disease of avocado using a complementary DNA probe to avocado sunblotch viroid. *Ann Appl Biol*: 98 (3): 439 - 450.

260 - Sano, T., M. Sasaki and E. Shikata. 1981. Comparative studies on hop stunt viroid, cucumber pale fruit viroid and PSTVd. *Ann. Phytopathol. Soc. JAP.* 47 (5) 599 - 605.

261 - Walter, B. 1981. A viroid on tomato in west Africa. Identity with PSTVd. *CR Seances Acad Sci Ser III Sci* 292 (8): 537 - 542.

أبحاث سنة ١٩٨٠ وما قبلها

262 - Hari, V. 1980. Ultrastructure of potato spindle tuber viroid-infected tomato leaf tissue. *Phytopathology.* 70 (5): 385 - 387.

263 - Harris, P. S. and I. A. Browning. 1980. The effects of temperature and light on the symptom expression and viroid concentration in tomato of a sever strain of PSTVd. *Potato Res.* 23 (1): 85 - 94.

264 - Mohamed, N. A. and W. Tomas. 1980. Viroid - like properties of an RNA species associated with the sunblotch disease of avocado. *J. Gen Virol.* 46 : 157 - 168.

265 - Palukaitis, P. and R. H. Symons. 1980. Purification and characterization of the circular and linear forms of chrysanthemum stunt viroid. *J. Gen Virol* 46 (2) 477 - 490.

266 - Semancik, J. S. and P. R. Desjardins. 1980. Multiple small RNA species and the viroid hypothesis for the sunblotch disease of avocado. *Virology.* 104 (1): 117 - 121.

267 - Silvergate, A. F. *et al.* 1980. Reduction of pith maceration by *Erwinia chrysanthemi* in chrysanthemum cuttings infected with CSVd. *Phytopathol*: 70 (2): 135 - 139.

268 - Takahashi, T. and H. Takusari. 1980. Some factores affecting mechanical transmission of hop stunt disease agent. *Phytopathol. Z.* 96 (4): 352 - 360.

269 - Velasco, J. R., A. S. Lansangan and E. Canapi. 1980. Island, Philippines: observations on coconut cadang - cadang. *Philipp. J coconut Stud.* 5 (1): 11 - 16.

270 - Wahn, K. F. and H. L. Saenger. 1980. Cytopathic changes in leaf tissue of *Gynura aurantiacae* infected with the viroid of citrus exocortis. *J. Gen Virol* 49 (2): 355 - 366.

271 - Palukaitis, P. *et al.* 1979. characterization of a viroid associated with avocado sunblotch disease. *Virology* 99 (1) : 145 - 151.

272 - ——— , ——1979. Hybridization analysis of chrysanthemum stunt viroid with complementary DNA and the quantitation of viroid RNA sequences in extracts of infected plants *Virology* 98 (1): 238 - 245.

273 - Riesner, D. *et al.* 1979. Structure and structure formation of viroids. *J. Mol Biol.* 133 (1) 85 - 116.

274 - Niblett, C. L. *et al.* 1978. Cross protection among four viroids. *Virology* 91 (1): 198 - 203.

275 - Sasaki, M. and E. Shikata. 1978. Studies on hop stunt disease : 2 properties of the causel agent, a viroid. *Rep Res Lab Kirin Brew* Co LTD. 0 (21): 41 - 48.

276 - ——— ———1978. Studies on hop stunt disease : 2 properties of a viroid. *Ann Phytopathol Soc. JPN.* 44 (5): 570 - 577.

277 - Schumann, G. L. *et al.* 1978. Comparison of tomato bioassay and slab gel electrophoresis for detection of PSTVd in potato. *Phytopathol.* 68 (9): 1256 - 1259.

278 -Semancik, J. S., L. K. Grill and E. L. Civerolo. 1978. Accumulation of viroid RNA in tumor cell after double infection by A. *tumefaciens* and citrus exocortis viroid. *Phytopath.* 68 (9): 1288 - 1292.

279 - Singh, R. P. and R. E. Williams. 1978. PSTVd: Circular dichroism spectrum and physical chemical studies of its interaction with ethidium bromide. *Can J. Biochem* 56 (10) : 934 - 938.

رقم الإيداع
١٩٩٦ / ٥٥٧٥

عربية للطباعة والنشر
١٠٠٧ شارع السلام ــ أرض اللواء المهندسين
تليفون : ٣٠٣١٠٤٣ ـ ٣٠٣٦٠٩٨

VIROID

AND VIROID DISEASES

DR. M. M. ABU-ARKOUB

هذا الكتاب

قبل أن نتكلم عن هذا الكتاب يجب أن نقول سبحان الله وصدق اذ يقول « سنريهم آياتنا فى الآفاق» إن الفيرويد من دلائل القدرة المطلقة لله سبحانه وتعالى ، ولا يستطيع المتخصص أن يدرك ذلك إلا إذا تخيل طول هذا المسبب وصفاته بالمقارنة مع الفيرس الذى هو أصغر مسبب مرضى قد عرف سابقاً .

لقد وضع هذا الكتاب فى عيد الميلاد الفضى لاكتشاف وتسمية الفيرويد ، وبالرغم من العمر القصير لهذا العلم إلا أنه تقدم بخطوات سريعة جدًا فى ظل التكنولوجيا العلمية الحديثة .

يعتبر هذا الكتاب الأول من نوعه الذى يخوض فى هذا المجال وإن كان قد سبقه نشرتين صغيرتين سنة ١٩٧٨ ، ١٩٨٢ فى كاليفورنيا عندما كانت الأمراض الفيرويدية لا تزيد عن سبعة أمراض أما الآن فهى بضع وثلاثون . قبل أن يبدأ القارىء الكريم تقليب صفحات هذا الكتاب نذكر تعريف الفيرويد ونقول إن الفيرويدات هى جزيئات من RNA معدية ذات وزن جزيئى منخفض أحادية الخيط تكون دوائر مغلقة ذات درجة عالية من تزاوج القواعد الداخلية وفيها مقاطع عديدة من القواعد المتكاملة والتى تشكل روابط هيدروجينية عبر الجزىء جاعلة الدوائر تنطوى وتعطى شكل ثنائى الخيط إلى حد ما . ولن نتكلم عن محتويات الكتاب فى هذا التخريج لأن ذلك مذكوراً فى المقدمة .

يسر الناشر أن يقدم هذا الكتاب بأنه أول لبنة توضع فى صرح علم الفيرويد للقارىء العربى والذى يكون مفيدًا لكل مهتم أو متخصص فى مجال العلوم البيولوجية الحديثة وهو أكثر فائدة وأهمية لاخصائى علم الهندسة الوراثة والكيمياء الحيوية الجزيئية وأمراض النبات حيث أن ولوجهم هذا الصرح يزيد إلى أنهار معارفهم جداول أخرى .

وبالله التوفيق

الناشر

أحمد أمين

I S B N : 977 - 281 - 020 - 4



ACADEMIC BOOKSHOP